

Cintia Gonçalves de Castro Correia

Factores de Risco Preditivos de Complicações  
em Crianças e Adolescentes  
com Diabetes Tipo 1

2018



Dissertação de Candidatura ao Grau de Doutor em Medicina,  
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.



# Júri da Prova de Doutoramento

**Presidente** **Doutor José Agostinho Marques Lopes**

Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Vogais** **Doutor Altamiro Manuel Rodrigues da Costa Pereira**

Professor Catedrático da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Doutor António José Mónica Silva Guerra**

Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Doutor Manuel Jorge Fontoura Pinheiro Magalhães**

Professor Associado Convidado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e orientador da tese

**Doutora Ana Isabel Gouveia Costa da Fonseca Lopes**

Professora Associada Convidada da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

**Doutora Catarina de Castro Sobral Blanco Limbert**

Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Lisboa

**Doutora Valentina Maria Fernandes Domingues**

Professora Adjunta do Instituto Superior de Engenharia do Porto



# Resumo

**Introdução:** A incidência global de Diabetes tem vindo a aumentar, sobretudo nas crianças mais jovens. Este aumento deve-se provavelmente a fatores ambientais, uma vez que se trata de uma modificação demasiadamente rápida para que se possa atribuir a fatores genéticos. Tendo em consideração este aumento da incidência de Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) e a constatação de que estamos expostos a diversos elementos químicos, torna-se fundamental que se investigue se há uma eventual relação entre ambas as situações. Algumas destas substâncias são disruptores endócrinos, ou seja, agentes exógenos (xenobióticos) que interferem com a produção, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormonas naturais no organismo, responsáveis pela manutenção da homeostasia e regulação de vários processos. Um dos objetivos deste projeto foi investigar a relação entre a exposição a alguns produtos químicos com esta capacidade de alteração endócrina e o diagnóstico de DMT1 ou o seu agravamento metabólico.

Tendo em consideração o facto de haver crianças diagnosticadas com esta patologia em idades muito jovens, o que implica um risco acrescido de complicações associadas à DMT1, foi ainda objetivo a identificação de marcadores preditivos de fatores de risco. A disfunção endotelial é um evento precoce na história natural da DMT1 e indicia um fenótipo de maior risco para aterosclerose e doença cardiovascular.

Assim, este projeto desenvolveu-se em duas linhas de investigação: uma associada à pesquisa de disruptores endócrinos que pudessem estar subjacentes ao desencadear de auto-imunidade precoce nas crianças, e ao diagnóstico de Diabetes tipo 1; outra associada à identificação de fatores determinantes do surgimento de complicações.

**Material e Métodos:** Dos doentes seguidos na Unidade de Endocrinologia Pediátrica, foram selecionados grupos de crianças e jovens sem complicações microvasculares e que não utilizavam qualquer outra medicação para além da insulinoterapia. Todos utilizavam esquema funcional de insulina, quer sob a forma de Múltiplas administrações diárias de insulina (MADI), com insulina glargina e análogos rápidos (lispro, asparto ou glulisina), quer sob sistema de infusão contínua de

insulina (SICI). No mesmo período de tempo, foram incluídas todas as crianças da mesma idade e com o diagnóstico de diabetes há menos de 6 meses, as quais constituíram o grupo de Diabetes inaugural (n = 13). O grupo controlo (n = 22 ) incluiu crianças saudáveis seguidas na consulta de Cirurgia Pediátrica e internadas para procedimentos cirúrgicos menor (correção de orelhas de abano, fimose, polegar em mola, por exemplo).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de S João e todos os pais/responsáveis parentais assinaram um consentimento informado antes do início do estudo.

Foram determinados os níveis urinários de bisfenol A, metabolitos de ftalatos (MiBP e DiBP), níveis séricos de pesticidas organoclorados (lindano (isómero gama de 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano) e alguns dos seus metabolitos: alfa - HCH ( $\alpha$ -Hexaclorociclohexano), beta-HCH (B-Hexaclorociclohexano), DDT, DDD (diclodifenildicloro-etano); e DDE (diclorodifenilodidicloroetileno). Relativamente aos fatores de risco de complicações cardiovasculares, foi determinado o perfil de ácidos gordos livres, assim como o estado antioxidante. Foi ainda avaliada a rigidez arterial, através da avaliação da VOP (Velocidade de Onda de Pulso).

**Resultados:** Encontraram-se valores de BPA e de pesticidas organoclorados inferiores aos relatados na literatura, sem aparente relação com o diagnóstico de DMT1; a presença de metabolitos de ftalatos parece associar-se ao diagnóstico desta doença.

As crianças com DMT1 apresentavam níveis mais elevados do que as crianças saudáveis de ácido alfa-linolénico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosohexaenóico (DHA), assim como de ácidos gordos polinsaturados. As crianças com diabetes recente tinham níveis de ómega-3 superiores ao grupo controlo, contrariando alguns achados anteriores.

Foi constatado que, crianças saudáveis apresentavam, no plasma, níveis elevados de ácidos gordos saturados e que, em todos os grupos analisados, a relação ómega-6/ómega-3 era muito superior às recomendações. Crianças diabéticas apresentavam um estado antioxidante inferior às crianças saudáveis, o que pode traduzir um consumo superior destes elementos, desde idades muito precoces. A rigidez arterial é uma manifestação sub-clínica de aterosclerose que se estabelece precocemente nas crianças com DMT1.

**Conclusões:** As diferenças entre o perfil de ácidos gordos e o estado oxidante entre crianças saudáveis, diabéticas e com diabetes inaugural, tem evidentes consequências clínicas no seguimento destas crianças. A presença tão frequente de manifestações sub-clínicas de complicações macrovasculares em crianças diabéticas reforça a necessidade de uma abordagem terapêutica de excelência neste grupo etário. Embora o pequeno tamanho amostral tenha sido um fator determinante de dificuldade na corroboração estatística de alguns dos achados, a relevância clínica destes justifica a realização de estudos populacionais alargados, em idade pediátrica.



# Abstract

**Introduction:** The overall incidence of Diabetes has been increasing, especially in younger children. This increase is probably due to environmental factors, since it is too rapid a change to be attributed to genetic factors. Considering this increase in the incidence of type 1 diabetes mellitus (T1DM) and the finding that we are exposed to several chemical elements, it is fundamental to investigate if there is a possible relation between both situations. Some of these substances are endocrine disruptors, that is, exogenous agents (xenobiotics) that interfere with the production, transport, metabolism, binding, action or elimination of natural hormones in the body, responsible for the maintenance of homeostasis and regulation of various processes. One of the objectives of this project was to investigate the relationship between the exposure to some chemicals with this capacity of endocrine alteration and the diagnosis of T1DM or its metabolic aggravation. Taking into account the fact that there are children diagnosed with this pathology at very young ages, which implies an increased risk of complications associated with T1DM, it was also an objective of this project the identification of predictive markers of risk factors. Endothelial dysfunction is an early event in the natural history of T1DM and indicates a phenotype of increased risk for atherosclerosis and cardiovascular disease. Thus, this project developed in two lines of research: one associated with the research of endocrine disruptors that could underlie the onset of early autoimmunity in children, and the diagnosis of T1DM; another associated with the identification of factors determining the appearance of complications.

**Material and Methods:** Of the patients followed in the Pediatric Endocrinology Unit, groups of children and young people without microvascular complications and who did not use any medication other than insulin therapy were selected. All of them used insulin functional regimens, either in the form of multiple daily insulin administrations, with insulin glargine and fast analogs (lispro, aspart or glulisine) or under continuous insulin infusion. In the same time period, all children of the same age and diagnosed with diabetes for less than 6 months were included, which were the inaugural Diabetes group (n=13). The control group (n=22) included healthy children followed up at the

Pediatric Surgery clinic and hospitalized for minor surgical procedures (correction of flap ears, phimosis, spring thumb, for example). The project was approved by the Ethics Committee of Hospital de S João and all parents/guardians signed informed consent prior to the start of the study. Urinary levels of bisphenol A, phthalate metabolites (MiBP and DiBP), and serum levels of organochlorine pesticides (lindane (gamma isomer of 1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane) and some of its metabolites: alpha-HCH (D-Hexachlorocyclohexane), beta-HCH (B-Hexachlorocyclohexane), DDT, DDD, and DDE (Dichlorodiphenyldichlorethylene) were determined. Regarding the risk factors for cardiovascular complications, the free fatty acid profile, as well as the antioxidant status, were determined. The arterial stiffness was also evaluated through Pulse Wave Velocity (PWV) evaluation.

**Results:** The values of BPA and organochlorine pesticides were lower than those reported in the literature, with no apparent relation to the diagnosis of T1DM; the presence of phthalate metabolites seems to be associated with the diagnosis of this disease.

Children with T1DM had higher levels than healthy children of alpha-linolenic acid, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), as well as polyunsaturated fatty acids. Children with recent diabetes had higher omega-3 levels than the control group, contrary to previous findings. It was found that healthy children had elevated levels of saturated fatty acids in plasma and that the omega-6/omega-3 ratio in all groups was far superior to the recommendations.

Diabetic children had a lower antioxidant status than healthy children, which may be related to a higher consumption of these elements, from very early ages.

Arterial stiffness is a subclinical manifestation of atherosclerosis that is established early in children with T1DM.

**Conclusions:** The differences between the fatty acid profile and the oxidant status among healthy, diabetic and diabetic children with early onset diabetes have evident clinical consequences in the follow-up of these children. The frequent presence of subclinical manifestations of macrovascular complications in diabetic children reinforces the need for a therapeutic approach of excellence in this age group. Although the small sample size was a determinant of difficulty in the statistical corroboration of some of the findings, the clinical relevance of these justifies the accomplishment of broad population studies in the pediatric age.

# Abreviaturas

<b>ADA</b>	<i>American Diabetes Association</i>
<b>AGE</b>	<i>Advanced Glycation End products</i>
<b>Apo-B</b>	Apolipoproteína B
<b>BPA</b>	Bisfenol A
<b>BPS</b>	Bisfenol S
<b>BPF</b>	Bisfenol F
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control and prevention</i>
<b>CIIS</b>	<i>Continuous Insuline Infusion subcutaneous</i>
<b>DCCT</b>	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
<b>DDD</b>	Diclorodifenilodiclороetano
<b>DDE</b>	Diclorodifenilodiclороetileno
<b>DDT</b>	Diclorodifenilotricloroetano
<b>DE</b>	Disruptores Endócrinos
<b>DEHP</b>	Dietilhexilo-ftalato
<b>DES</b>	Dietiletilbestrol
<b>DMT1</b>	Diabetes mellitus tipo 1
<b>DMT2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>
<b>EPA</b>	<i>Environmental Protection Agency</i>
<b>ER-alfa</b>	<i>Estrogen Receptor alfa</i>
<b>ER-Beta</b>	<i>Estrogen Receptor Beta</i>
<b>FFA</b>	<i>Free Fatty Acids</i>
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina Glicosilada
<b>HCH</b>	Hexaclorociclohexano
<b>HDL</b>	<i>High Density Lipoprotein</i>
<b>IDF</b>	<i>International Diabetes Federation</i>
<b>IL-1B</b>	Interleucina 1 beta

<b>IMC</b>	Índice de Massa Corporal
<b>IMT</b>	<i>Intima-Media Thickness</i>
<b>INF-gama</b>	Interferão gama
<b>ISPAD</b>	<i>International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes</i>
<b>LDL</b>	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
<b>LOAEL</b>	<i>Lowest Observable Adverse Effect Level</i>
<b>LOD</b>	<i>Limit Of Detection</i>
<b>LOQ</b>	<i>Limit Of Quantification</i>
<b>NHANES</b>	<i>National Health and Nutrition Examination Survey</i>
<b>NIDDK</b>	<i>National Institute of Diabetes and Kidney Diseases</i>
<b>NO</b>	Monóxido de azoto
<b>NOD</b>	<i>Non-Obese Diabetic</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBB</b>	Bifenilos Polibromados
<b>PCB</b>	Bifenilo Policloronado
<b>PCDD</b>	Dioxinas dibenzopolicloronadas
<b>PCB</b>	Bifenilos Policlorados
<b>PCOS</b>	<i>Polycystic Ovary Syndrome</i>
<b>POP</b>	Poluentes Orgânicos Persistentes
<b>PVC</b>	<i>PolyVinyl Chloride</i>
<b>ROS</b>	<i>Reactive Oxygen Species</i>
<b>TA</b>	Tensão Arterial
<b>TEDDY</b>	<i>The Environmental Determinants of Diabetes in the Young</i>
<b>TG</b>	<i>Triacilglicerois</i>
<b>Th1</b>	<i>T helper 1</i>
<b>Th2</b>	<i>T helper 2</i>
<b>TNF-alfa</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>VOP</b>	Velocidade de Onda de Pulso
<b>WWF</b>	<i>World Wildlife Fund</i>

# Índice

1. Introdução	19
<b>1.1. Introdução Geral</b>	<b>21</b>
<b>1.2. Disruptores Endócrinos</b>	<b>25</b>
1.2.1. Bisfenol A	25
1.2.2. Ftalatos	27
1.2.3. Pesticidas	28
<b>1.3. Fatores Preditivos de Complicações</b>	<b>39</b>
<b>1.4. Fatores de Risco de Doença Cardiovascular</b>	<b>41</b>
1.4.1. Hiperglicemia	41
1.4.2. Hiperlipidemia	41
1.4.3. Stresse Oxidativo	42
<b>1.5. Manifestações de Doença Cardiovascular Sub-Clínica</b>	<b>43</b>
1.5.1. Rigidez Arterial	43
2. Objetivos	45
3. Resultados e Discussão	49
<b>3.1. Disruptores Endócrinos</b>	<b>51</b>
3.1.1. BPA	51
3.1.2. Ftalatos	61
3.1.3. Pesticidas Organoclorados	66

<b>3.2. Fatores de Risco Preditivo de Complicações</b>	<b>79</b>
3.2.1. Fatores de Risco de Doença Cardiovascular	80
3.2.1.1. Fatores de Risco - Hiperlipidemia	86
3.2.1.2. Fatores de Risco - Stress Oxidativo	94
3.2.2. Manifestações Sub-Clínicas	99
 4. Conclusões	 109
 5. Referências	 113

# Agradecimentos

Um projeto de investigação começa com uma ideia, um objetivo, mas que é impossível de atingir sem o apoio de um conjunto de pessoas que partilham o mesmo ideal. Sem essas pessoas, este projeto provavelmente não teria sido iniciado, e de certeza que não teria terminado...

Quero agradecer ao meu Orientador, Professor Doutor Manuel Fontoura, pelo seu incentivo, pelo seu apoio e exemplo. Pela sua amizade e por tudo o que me ensina diariamente. A ele devo o meu interesse pela Endocrinologia Pediátrica, assim como o gosto pela investigação aliada à clínica. Agradeço-lhe sinceramente as suas palavras de incentivo e de confiança, que me ajudaram a manter-me firme nos meus propósitos. É uma honra tê-lo como Orientador.

Agradeço também à minha Co-Orientadora, Professora Doutora Conceição Calhau, que acreditou no meu projeto, e me deu a mão desde o início. Sem o seu apoio, seria impossível realizá-lo. Mesmo após ter deixado o Porto, manteve-se sempre presente e disponível. A sua orientação foi imprescindível.

Não posso deixar de agradecer à Professora Doutora Valentina Fernandes, que permitiu a realização de grande parte do trabalho laboratorial presente neste projeto e cuja colaboração foi valiosa.

Agradeço aos meus colegas do serviço de Pediatria pelo apoio e incentivo que me deram. Entre eles, uma palavra especial para a equipa da Unidade de Endocrinologia, que teve um papel fundamental neste trabalho.

Por fim, quero agradecer à minha família: ao meu Pai, pelo seu exemplo, à minha Mãe, por estar incondicionalmente do meu lado, ao João Paulo, que acredita sempre que eu consigo, e aos meus filhos, que toleraram muitas ausências da Mãe.





## Preâmbulo

Em 2010 terminei o Ciclo de Estudos Especiais em Endocrinologia Pediátrica. No âmbito desse ciclo tive contacto com várias áreas da Endocrinologia que começavam a dar os primeiros passos. Uma dessas áreas era a dos alteradores ou disruptores endócrinos. Em 2009, foram publicados os consensos da *Endocrine Society* sobre este tema, e que tiveram um enorme impacto, quer do ponto de vista clínico, quer relativamente à investigação científica neste domínio. Foram também o ponto de partida deste projeto.

Por outro lado, o contacto diário com crianças diagnosticadas cada vez mais cedo com Diabetes tipo 1, fez com que me questionasse acerca das consequências deste diagnóstico em idades tão precoces.

Sempre tive a noção que seria muito importante aliar a clínica à investigação, e que a união entre disciplinas básicas e clínicas é indispensável à progressão de ambas. Não esperava, no entanto, encontrar tantas dificuldades como as que surgiram ao longo deste caminho. A maior de todas, foi sem dúvida, o tempo... a atividade clínica é muito recompensadora, mas extremamente absorvente. Por outro lado, foi imprescindível contar com o apoio do Laboratório, onde sempre me senti recebida com entusiasmo pelo projeto, mas onde também ocorreram algumas vicissitudes, demoras na obtenção de resultados ou mesmo avarias no material técnico!

Quando iniciei o projeto a tempo parcial, tinha como objetivo terminar em 2015. Embora isso não tenha sido possível, foi um processo de crescimento e maturação, que me fez manter a esperança de que, um dia, a investigação passe a ser rotina na prática clínica.



# Capítulo I

## Introdução

21 — Introdução Geral

25 — Disruptores Endócrinos

39 — Factores Preditivos de Complicações

41 — Factores de Risco de Doença Cardiovascular

43 — Manifestações de Doença Cardiovascular Sub-Clínica



## 1.1. Introdução Geral

A Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) é uma doença crónica caracterizada por hiperglicemia persistente, resultante da deficiência de produção de insulina devido à lesão das células beta pancreáticas<sup>1</sup>.

De acordo com a *International Diabetes Federation* (IDF), 8,8% da população adulta mundial sofre de diabetes<sup>2</sup>. Apenas 10-15% apresentam DMT1, sendo a diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) a forma mais prevalente. Apesar do aumento da incidência da DMT2 que será associada ao aumento da obesidade<sup>3</sup>, a DMT1 continua a ser a mais prevalente, em idade pediátrica.

Em Portugal, e de acordo com os dados do Registo Nacional - DOCE, em 2015, existiam 3327 crianças e jovens (0-19 anos) com DMT1, o que corresponde a 0,16% da população<sup>4</sup>. No mesmo ano, a incidência foi de 13,3 novos casos por cada 100000 jovens com idades entre 0-14 anos<sup>4</sup>. A taxa de incidência mostra um valor máximo entre os 12 e os 14 anos de idade<sup>5</sup>, sendo idêntica nos dois sexos<sup>6</sup>. Existe uma variação sazonal no aparecimento da DMT1, com mais casos diagnosticados nos meses de inverno, coincidente com o aparecimento de autoimunidade pancreática<sup>7</sup>.

Na maior parte dos doentes (70 - 90%), a perda de células beta ocorre em consequência da agressão autoimune, resultante da formação de autoanticorpos, designando-se este tipo de diabetes como DMT1 autoimune ou tipo 1a<sup>1</sup>. Uma percentagem inferior de doentes não apresenta auto anticorpos e a causa desta destruição das células beta permanece desconhecida: DMT1 idiopática ou tipo 1b. Neste caso, há frequentemente um componente genético importante<sup>8</sup>.

O aparecimento de auto anticorpos inicia-se meses ou anos antes da sintomatologia habitual da DMT1. Os autoanticorpos relacionados com esta patologia são os anti insulina, anti descarboxilase do ácido glutâmico 65 KDa (GAD65), anti transportador de zinco 8 (ZNT8) ou anti proteína 2 associada ao insulinoma (IA-2)<sup>9</sup>.

Embora a DMT1 seja uma doença autoimune, tem como base uma predisposição genética. O seu risco está fortemente associado aos haplótipos DR3 e DR4 da classe II do HLA, sobretudo ao genótipo DR3/DR4<sup>10</sup>. Estudos recentes têm vindo a encontrar vários outros genes que podem aumentar esta tendência<sup>11</sup>. Os genes HLA parecem contribuir sobretudo para o desenvolvimento de autoanticorpos, enquanto os outros genes parecem ter um papel mais importante na progressão para doença<sup>12</sup>. Cerca de 85% dos doentes com DM1 não têm história familiar de diabetes, embora a existência de familiares com esta patologia aumente o risco relativo de doença.

O primeiro passo para o aparecimento desta patologia é o desencadear de autoimunidade, com a presença de um autoanticorpo. Depois surge autoimunidade estabelecida (com dois ou mais autoanticorpos), em seguida, intolerância à glicose, e posteriormente, hiperglicemia persistente<sup>9</sup>. O risco de progressão para o estágio sintomático da doença depende do número de autoanticorpos existente e da idade de seroconversão<sup>13</sup>. No estudo TEDDY, a taxa de incidência de DM1 após 5 anos de seroconversão era de 11%, 36% e 47% naqueles com um, dois ou três autoanticorpos, respetivamente<sup>6,14</sup>. A velocidade de progressão parece ser um pouco mais rápida nas raparigas e nas crianças que apresentam autoimunidade nos primeiros 3 anos de vida<sup>15,16</sup>.

A incidência global de diabetes tem vindo a aumentar, numa percentagem de cerca de 3-4% por ano, sobretudo nas crianças mais jovens<sup>17</sup>. Este aumento deve-se provavelmente a fatores ambientais, uma vez que se trata de uma modificação demasiadamente rápida para que se possa atribuir a fatores genéticos<sup>10</sup>. Os emigrantes adquirem o mesmo risco de DMT1 que a população da sua área de residência, o que é mais um argumento a favor da importância do ambiente no desencadear desta patologia<sup>18</sup>. Na Europa, o risco de DMT1 difere de modo importante entre populações próximas do ponto de vista genético, mas separadas por diferenças socioeconómicas<sup>19</sup>. Os fatores ambientais que têm vindo a ser ponderados incluem infeções, dieta, exposição a disruptores endócrinos e outros<sup>20</sup>. Estes factores parecem poder desencadear estes fenómenos mesmo que presentes in utero ou durante a primeira infância<sup>20</sup>.

Outro fator ambiental que parece efetivamente promover a autoimunidade é o stresse das células beta. Esta hipótese propõe que fatores que aumentem as necessidades de insulina, como crescimento rápido, excesso de peso, puberdade, baixa atividade física, traumatismo, infeções e sobrecarga de glicose aumentam a probabilidade de DMT1<sup>21,22</sup>.

Tendo em consideração o aumento da incidência de DMT1 nas últimas décadas e a constatação de que estamos expostos a diversos xenobióticos, torna-se fundamental que se investigue se há uma eventual relação entre ambas as situações.

De facto, a partir da década de 40 do século XX, houve uma grande evolução na indústria química e graças a isto, deu-se início a uma era de utilização de produtos químicos numa enorme diversidade de sectores, e em áreas tão díspares como a agricultura, a construção civil ou a cosmética.

A designação de Disruptores Endócrinos (DE) surgiu pela primeira vez em 1991, numa conferência promovida pelo *World Wildlife Fund* (WWF – Fundação Mundial de Vida Selvagem), e em que, da reunião de investigadores de diversas áreas, emergiu este conceito<sup>23</sup>.

Disruptores ou alteradores endócrinos estão definidos pela Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* -EPA) como agentes exógenos que interferem com a produção, transporte, metabolismo, ligação, ação ou eliminação de hormonas naturais no organismo, responsáveis pela manutenção da homeostasia e regulação de vários processos<sup>24</sup>.

Estas substâncias constituem um grupo marcadamente heterogénio, e incluem químicos de origem antropogénica usados como solventes industriais e os seus derivados (bifenilos policlorados - PCBs, dioxinas), aditivos dos plásticos (bisfenol A - BPA, ftalatos), pesticidas (metoxicloro, cloropirifos, diclorodifeniltricloroetano - DDT), fungicidas (vinclozolina), agentes farmacêuticos (dietilestilbestrol - DES) e conservantes (parabenos)<sup>25</sup>, entre muitos outros.

A avaliação do seu impacto na saúde tem sido muito difícil por diversas razões. Existem algumas substâncias cuja utilização foi proibida nos últimos anos, mas pelo facto de se tratar de produtos com elevada capacidade de permanência no meio ambiente, ainda podem ser encontrados, em quantidades diferentes, de acordo com a sua anterior utilização<sup>25</sup>. A migração das populações também dificulta a análise das diferentes substâncias e mesmo dentro da mesma área geográfica, diferentes pessoas apresentam níveis distintos de exposição de acordo com o seu estilo de vida<sup>25</sup>.

Por outro lado, embora do ponto de vista da investigação científica, seja comum estudar o efeito de cada uma destas substâncias isoladamente, no ambiente elas existem em conjunto, e é expectável que possam interagir entre si, podendo o seu efeito ser aditivo<sup>26</sup>.

Os DE acumulam-se na cadeia alimentar, encontrando-se o ser humano no topo desta cadeia, e consequentemente sendo um alvo importante de deposição de produtos tóxicos<sup>25</sup>. Em geral, os DE têm uma baixa solubilidade na água, mas são extremamente lipossolúveis, levando à sua acumulação no tecido adiposo<sup>25</sup>. A exposição a estas substâncias pode ocorrer também através da ingestão de água, inalação ou contacto da pele<sup>25</sup>.

A susceptibilidade à exposição a estas substâncias que é diferente em cada indivíduo, depende do seu genoma<sup>25</sup>. Os efeitos no ser humano podem ser mais graves devido à sua suscetibilidade à ação de várias substâncias químicas em relação aos animais frequentemente utilizados em laboratórios. Estes têm uma mais elevada taxa metabólica, que se relaciona de modo inverso com o seu tamanho.

Outra das dificuldades que se coloca ao investigar as ações destes produtos tem a ver com o período de latência que existe entre a exposição e o aparecimento dos seus efeitos<sup>25</sup>. Sabe-se atualmente que existem determinadas fases na vida do indivíduo em que há uma maior vulnerabilidade à ação destas substâncias, mas cujos efeitos são de aparecimento tardio. É o que está implícito no conceito de “Base Fetal de doença adulta”<sup>28, 29, 30</sup>, também designada por Hipótese de *Barker*, em homenagem ao investigador que desenvolveu esta teoria. Efetivamente, no período fetal e neonatal existe uma elevada suscetibilidade para este tipo de interação com repercussão ao longo da vida adulta, numa reinterpretação de Paracelsus, de que a “dose define o veneno”, para que o timing da exposição é igualmente determinante na toxicidade<sup>31</sup>.

Tendo em consideração três factos, ou seja, (1) a constatação, nos últimos anos, na prática clínica, da maior incidência global de DMT1, (2) em idades mais jovens, e (3) que a rapidez com que tem surgido não poderá traduzir alterações genéticas, fundamenta a necessidade de identificar os fatores ambientais possivelmente envolvidos, tendo sido, para tal, desenhado o presente projeto de investigação.

Uma vez que, a este aumento de incidência acrescerá inevitavelmente, um aumento de jovens adultos com muitos anos de doença e com o consequente risco importante de complicações, pretendemos avaliar a presença de marcadores de risco das mesmas. As complicações micro e macrovasculares são a principal causa de morbilidade e mortalidade em indivíduos com DMT1<sup>32</sup>. A disfunção endotelial é um evento precoce na história natural da DMT1 e indicia um fenótipo de maior risco para aterosclerose e doença cardiovascular<sup>33,34</sup>.

Assim, este projeto envolveu duas linhas de investigação: uma associada à pesquisa de disruptores endócrinos que pudessem estar subjacentes ao desencadear de autoimunidade precoce nas crianças, e ao diagnóstico de diabetes tipo 1; outra, ligada à pesquisa de fatores determinantes no surgimento de complicações, mas cuja idade de aparecimento está ainda por determinar. Os ensaios clínicos em idade pediátrica são escassos, o que dificulta a decisão baseada na evidência.



## 1.2. Disruptores Endócrinos

### 1.2.1. Bisfenol A

Muitos destes DE actuam através de mecanismos de mimetismo estrogénico<sup>25</sup>. Sabe-se atualmente que os xenoestrogénios são importantes no equilíbrio energético e homeostasia da glicose<sup>35,36</sup>. O bisfenol A (BPA) é um dos xenoestrogénios capaz de mimetização estrogénica e provavelmente, desta forma, interferência com a regulação do controlo glicémico<sup>37</sup>.

O BPA foi sintetizado pela primeira vez em 1891 e em 1930 já era conhecido o seu papel como xenoestrogénio<sup>38</sup>. Nos anos 50, o BPA foi redescoberto como um composto que poderia ser utilizado na produção de plástico, sendo a partir daí utilizado numa enorme quantidade de produtos<sup>37</sup>. O BPA é usado na manufatura de plástico policarbonado, no revestimento de embalagens de várias bebidas e alimentos, sendo um aditivo comum noutros tipos de plástico<sup>37</sup>.

Vários trabalhos mostram que o BPA, sob a acção do calor ou na presença de meios ácidos ou alcalinos, pode migrar da embalagem para o conteúdo, seja alimento ou outro, aumentando assim o risco de exposição humana<sup>39</sup>. Isto tornou-se patente após estudos que avaliaram a presença de BPA em amostras humanas, como o estudo NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), onde identificaram a presença desta substância em 95% das amostras de urina obtida em indivíduos residentes nos EUA<sup>40</sup>.

Em 1980, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) considerou tolerável uma exposição diária a níveis de BPA até 50 µg/kg/d (*Lowest Observable Adverse Effect Level* - LOAEL). No entanto, desde essa data existe numerosa evidência científica que veio demonstrar uma ação deste agente como disruptor endócrino, mesmo com níveis de exposição muito inferiores às indicadas, particularmente durante a idade pediátrica<sup>37,41</sup>.

Mesmo com níveis extremamente baixos, o BPA parece influenciar a homeostasia da glicose, através da interferência na libertação de glicagina pelas células alfa pancreáticas, durante episódios de hipoglicemia<sup>42</sup>. Quando presente em níveis muito inferiores aos eventualmente permitidos, o BPA pode induzir a secreção de insulina, resultados obtidos em modelos animais<sup>43</sup>.

Em modelos animais, a exposição diária a 100µg/kg de BPA desencadeou um aumento do número de células beta, assim como o seu conteúdo de insulina<sup>43</sup>, despoletando, simultaneamente, insulino-resistência.

Há cerca de 10 anos que se equaciona um efeito do BPA como indutor de resistência à insulina. Recentemente, tem-se vindo a ponderar uma eventual ligação à DMT1, e ao aumento da sua incidência. Esta hipótese é mais difícil de ser confirmada, dada a incidência da DMT1 ser mais baixa do que a DMT2, o que torna a realização de estudos prospetivos mais complexa<sup>44</sup>. Adicionalmente, há bastante investigação que associa exposição a este DE a efeitos relacionados com alterações do sistema imunológico, em doenças como a asma, as alergias e alterações do sistema inflamatório, presentes nas doenças cardiovasculares<sup>45,46,47</sup>.

Bodina e colaboradores examinaram os efeitos da exposição a BPA, ftalatos e uma combinação de exposição simultânea a estes dois disruptores endócrinos no desenvolvimento de DMT1 em cobaias NOD (*Non-Obese Diabetic*)<sup>44</sup>. Constataram que nas cobaias de 4 e 11 semanas de idade, havia uma percentagem de insulite de 62,5% e 75% nas expostas ao BPA e nas expostas à combinação de BPA com ftalatos, relativamente a uma percentagem marcadamente inferior nos controlos (37,5%)<sup>44</sup>, sugerindo haver uma acção sinérgica entre estes fatores. Este trabalho mostrou também que a curva de resposta a esta substância não é monotónica e, contrariamente ao que sucede em algumas áreas da toxicologia, não se podem inferir a existência de doses seguras e outras a partir das quais a exposição determine maior risco para a saúde<sup>44</sup>.

A persistência dos investigadores, que foram demonstrando de modo inequívoco o potencial risco associado ao BPA motivou mudanças importantes na indústria. Isto determinou que se tivessem procurado alternativas a este produto. Assim, o BPA tem vindo a ser substituído por outro químico, designado bisfenol S<sup>48</sup>. Este composto tem maior estabilidade relativamente à exposição a temperaturas elevadas e à luz solar, sendo ainda menos biodegradável<sup>48</sup>. Infelizmente, a prática da utilização de produtos químicos, com um profundo desconhecimento quanto aos seus eventuais efeitos adversos, persiste. O BPS está neste momento a ser utilizado na produção de plásticos, pacotes de alimentos, e muitos outros produtos<sup>49</sup>.

O impacto da sua utilização em saúde pública está longe de ser avaliado, só começando agora a ser alvo de investigação científica.

### 1.2.2. Ftalatos

Os ftalatos são um grupo de produtos químicos usados no fabrico de materiais plásticos como o PVC<sup>50</sup>. Estes compostos passam com facilidade para o ar ou para outros meios com os quais estejam em contacto<sup>51</sup>. Devido a este facto, e também por serem utilizados em larga escala, estes químicos encontram-se disseminados no ambiente, estando presentes por exemplo, em brinquedos, materiais de construção e embalagens alimentares<sup>51</sup>. A sua produção tem aumentado significativamente<sup>52</sup> e o seu impacto em termos de saúde pública é corroborado pelo facto de, em mais de 75% da população americana, se encontrarem ftalatos na urina<sup>53</sup>.

Entre os ftalatos, destaca-se o composto dietilhexilo-ftalato (DEHP) por ser um dos componentes mais importantes de alguns plásticos e poder constituir até cerca de 40% da estrutura do PVC<sup>50</sup>. O DEHP encontra-se fracamente ligado ao PVC e pode libertar-se, migrando para a matriz alimentar ou outros materiais<sup>54</sup>. Os ftalatos funcionam também como disruptores endócrinos e são capazes de alterar o metabolismo da glicose e a adipogénese<sup>55,56,57</sup>.

Estas alterações têm vindo a ser demonstradas em estudos de experimentação animal, que mostram uma associação entre a exposição a DEHP e a ocorrência de perturbações metabólicas<sup>58</sup>. Em ratos, o DEHP parece induzir uma diminuição da tolerância à glicose, assim como modificações do conteúdo de glicogénio hepático<sup>59</sup>. O início de DM2 e síndrome metabólico após exposição a DEHP parece ser causado por um agravamento da insulinoresistência<sup>60</sup>. Sabe-se que a exposição a estes xenobióticos pode aumentar o stresse oxidativo<sup>60</sup>.

Em modelos animais, constatou-se que a exposição de células beta a ftalatos provoca diminuição do seu número e alterações morfológicas<sup>61</sup>. Quer estudos em animais, quer estudos humanos mostraram que o DEHP tem capacidade para induzir lesão do DNA<sup>62</sup>. Isto pode ter implicações na capacidade de síntese de insulina.

### 1.2.3. Pesticidas

Os pesticidas são um grupo de químicos usados para a destruição de insetos, fungos, bactérias ou plantas consideradas parasitas<sup>63</sup>. A maior parte destes produtos tem como objectivo alterar a fisiologia de um organismo alvo, levando à sua disfunção e morte<sup>63</sup>. Os seus resíduos constituem uma importante fonte de contaminação ambiental<sup>63</sup>. Algumas características destes produtos, como a lipofilia, com consequente acumulação preferencial na gordura, bioacumulação e semi-vida longa aumentam a probabilidade de contaminação da água, ar e solos, mesmo muitos anos após a sua aplicação<sup>63</sup>. Os pesticidas organoclorados são um grupo de químicos que pertencem à classe dos Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), que, como o seu nome indica, têm uma elevada persistência no ambiente<sup>63</sup>.

Devido ao seu baixo custo e capacidade de atuar sobre múltiplos agentes, os pesticidas organoclorados como o DDT (diclorodifenilotrictloroetano), hexaclorociclohexano (HCH), aldrina e dieldrina, foram largamente utilizados<sup>64</sup>.

O DDT foi o pesticida deste género mais utilizado na agricultura, e tem uma semi-vida de 2 a 15 anos<sup>65</sup>. A sua utilização foi proibida em muitos países, nomeadamente após a Convenção de Estocolmo, no entanto, continua ainda a ser utilizado em alguns países em vias de desenvolvimento. O mesmo se aplica ao endossulfano, tendo este composto uma semi-vida menor<sup>66</sup>.

Alguns dos estudos sobre a associação entre pesticidas e alteração endócrina resultaram de exposições acidentais a quantidades importantes destas substâncias. Assim, em 1973, cerca de 4000 indivíduos foram expostos acidentalmente a compostos de bifenilos polibromados (PBB),<sup>67</sup> tendo-se constatado que as suas filhas apresentaram uma idade mais precoce de menarca do que controlos, na ausência a esta exposição<sup>67</sup>. Há também bastante investigação ligada à experimentação animal. Rasier e colaboradores confirmaram que o Rato submetido à exposição *in utero* a DDT apresenta uma maior precocidade sexual<sup>68</sup>. Mais, as meninas adoptadas em países desenvolvidos, mas provenientes de regiões em que a utilização do DDT como inseticida ainda é permitida, apresentam maior precocidade sexual<sup>69</sup>. Nas meninas, a exposição ao DDT associa-se a uma menarca precoce<sup>70</sup>.

Sabe-se que outros xenoestrogénios, como as dioxinas, em meninas pré-púberes, provocam telarca precoce; relativamente aos PBBs (bifenilos polibromados), a exposição está associada a telarca, pubarca e menarca precoces<sup>70</sup>.

Há muitos trabalhos que apontam para uma relação entre a exposição a estes produtos químicos e consequente perturbação do desenvolvimento sexual, podendo este efeito estabelecer-se em diferentes grupos etários pediátricos e mostrando também um provável efeito epigenético. Por outro lado, começaram a surgir estudos que procuram investigar uma relação entre a exposição a estes compostos e a desregulação da homeostasia da glicose<sup>71</sup>.

No entanto, têm-se centrado sobretudo na diabetes tipo 2. Considerando que pode haver um papel do stresse sobre a célula beta, nomeadamente com alguma sobrecarga da mesma e eventual insulinoresistência, que parece preceder por vezes o aparecimento de DMT1, poder-se-à equacionar a existência de uma relação entre a exposição a estes produtos e o desendear desta doença<sup>72</sup>.

Apesar de se poder ponderar a existência desta relação, não existem praticamente estudos em humanos acerca da eventual interacção dos organoclorados com alterações do funcionamento do sistema imunológico, como as que se sabe estarem presentes nas crianças e jovens com DMT1. No entanto, começam agora a surgir trabalhos na área da biologia que investigam esta potencial relação noutros mamíferos<sup>73</sup>.





## Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo

[www.elsevier.pt/rpedm](http://www.elsevier.pt/rpedm)



### Review

## A influência da exposição ambiental a disruptores endócrinos no crescimento e desenvolvimento de crianças e adolescentes



CrossMark

C. Castro-Correia e M. Fontoura

Serviço de Pediatria, Unidade de Endocrinologia e Diabetologia Pediátrica, Centro Hospitalar de S. João, Faculdade de Medicina do Porto, Porto, Portugal

### INFORMAÇÃO SOBRE O ARTIGO

#### Historial do artigo:

Recebido a 12 de janeiro de 2014

Aceite a 21 de outubro de 2014

On-line a 14 de abril de 2015

#### Palavras-chave:

Disruptores endócrinos

Doenças endócrinas

Pediatria

Puberdade precoce

### R E S U M O

Os disruptores endócrinos (DE) são substâncias exógenas ao corpo humano e que interferem na síntese, secreção, transporte, metabolismo ou eliminação das diferentes hormonas. Nele se inclui um grupo muito heterogêneo de compostos, que vão desde químicos sintéticos a alguns produtos constituintes naturais de algumas plantas. A avaliação do seu impacto na saúde é extremamente difícil, mas sabe-se atualmente que existem diversas patologias em que estas substâncias podem ter um papel determinante, como causadoras ou amplificadoras das suas manifestações.

A exposição das crianças às ações dos disruptores endócrinos é particularmente preocupante. As crianças têm frequentemente contato com o solo e plantas, levando mãos e objetos à boca, bebem, comem e respiram proporcionalmente mais do que os adultos, e o seu metabolismo mais rápido torna-as particularmente susceptíveis à ação tóxica destes produtos. A exposição durante a vida fetal e perinatal, em fases críticas do desenvolvimento pode ter múltiplas repercussões negativas a longo prazo. Os autores fazem uma breve revisão do atual conhecimento nesta área e das principais repercussões em patologias endócrinas que lhe estão associadas.

É necessário que a comunidade científica se mantenha empenhada neste tema e que a população se informe ativamente acerca do risco devido à presença destas substâncias, alterando comportamentos e promovendo medidas de evicção, sobretudo no feto e na criança.

© 2014 Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### The influence of environmental exposure to Endocrine Disruptors in the growth and development of children and adolescents

### A B S T R A C T

Endocrine disruptors (ED) are exogenous substances to the human body and that interfere with the synthesis, secretion, transport, metabolism or elimination of various hormones. These substances are a very heterogeneous group that includes multiple products, from synthetic chemicals to other substances which are present in some plants. The assessment of their impact on health is extremely difficult, but we know now that there are several diseases in which they have a decisive role, either causing the disease itself or aggravating it.

Exposure to endocrine disruptors in children is a major concern due to the frequent contact with potentially contaminated soil. Besides, children eat, drink and breathe more per body weight compared with adults, and their fast metabolism ensures a higher level of risk. Their exposure to these products ensues in the fetal and perinatal period, in a very important period of their development, unleashing negative consequences on the long run.

It is necessary that the scientific community studies this subject and that the people gets informed about the risks related to these substances, changing behaviors and promoting avoiding measures, mainly concerning the children. The authors review some of the current knowledge in this area, and the main endocrine pathologies associated, seeking to foster reflection on this subject.

© 2014 Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpedm.2014.10.002>

1646-3439/© 2014 Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## Introdução

No mundo industrializado em que vivemos, inebriados pelos avanços tecnológicos que aumentam o nosso conforto e bem-estar, é relativamente fácil ignorar as consequências e repercussões negativa resultantes da grande utilização de produtos químicos que de forma intensiva são usados em vários setores industriais.

Nas últimas décadas temos assistido a um significativo aumento da prevalência de desvios do desenvolvimento fisiológico normal e na incidência de muitas patologias pediátricas anteriormente consideradas raras<sup>1</sup>. Em muitas destas situações a fisiopatologia não está esclarecida e esse desconhecimento permite especular que na sua génese possam estar envolvidos fenómenos de desregulação endócrina.

A tomada de consciência deste problema é, para além de uma preocupação da sociedade atual, um tema importante de debate na comunidade científica internacional que procura respostas sobre qual a repercussão e mecanismos de ação dos contaminantes ambientais na saúde infantil e juvenil, e suas consequências a longo prazo.

Por disruptores endócrinos (DE) designam-se todas as substâncias exógenas ao corpo humano e que possam interferir na síntese, secreção, transporte, metabolismo ou eliminação das diferentes hormonas<sup>2</sup>.

Nelas se inclui um alargado e heterogéneo grupo de compostos, tais como químicos sintéticos usados em solventes industriais e os seus derivados (bifenilos policlorados – PCB, dioxinas), em plásticos (bisfenol A – BPA, ftalatos), nos pesticidas (metoxicloro, cloropirifos, diclorodifeniltricloroetano – DDT), em fungicidas (vinclozolina), em vários produtos farmacêuticos (dietilestilbestrol – DES) e em conservantes (parabenos).

Para além destes, também na nossa cadeia alimentar é possível encontrar disruptores endócrinos constituintes naturais de muitas plantas. São globalmente designados por fitoestrogénios, de que são exemplo as isoflavonas, que existem em quantidades consideráveis em certas plantas como a soja<sup>3</sup>.

Com este trabalho, os autores têm como objetivo fazer uma breve revisão do estado atual do conhecimento relativo a este tipo de substâncias e de qual o seu impacto na saúde infantil e juvenil.

Como em muitas outras situações, também nesta em particular as crianças constituem um grupo de maior risco. No decurso das suas atividades lúdicas com facilidade contactam diretamente com o solo e plantas que os podem expor, de forma inadvertida, a doses elevadas de alguns destes produtos. As crianças, sobretudo as mais jovens, têm uma frequência respiratória mais elevada, o que condiciona a possibilidade de, em ambientes contaminados, terem uma maior inalação de eventuais produtos tóxicos. O facto de a relação entre o volume de líquidos e de alimentos ingeridos e o peso corporal ser superior ao verificado nos adultos, justifica que haja uma maior quantidade relativa de ingestão de substâncias tóxicas.

A exposição a substâncias com capacidade de disrupção endócrina pode começar muito cedo, mesmo in-utero, através da passagem trans-placentária, ou logo na fase perinatal.

A exposição muito precoce a estas substâncias comporta um risco imediato mais elevado devido à imaturidade de todos os sistemas fisiológicos do neurodesenvolvimento, mas implica também um maior risco ao longo da vida do indivíduo, pelas respostas adaptativas que condiciona e pelo aumento exponencial de exposição que condiciona a probabilidade de surgirem patologias.

## Métodos

Os autores efetuaram uma pesquisa bibliográfica extensa, a partir da base *pubmed*, utilizando como palavras-chave: disruptores endócrinos, bisfenolA, parabenos, ftalatos e dioxinas.

Foram revistos artigos publicados desde 0 ano 2000 até à presente data, procurando incluir toda a bibliografia relevante. Excepcionalmente serão mencionados artigos anteriores a esta data, pela sua importância e impacto em investigação posterior.

## Revisão

O mecanismo de ação dos DE é ainda em grande parte desconhecido. As ações dos DE podem ser mediadas pela ligação direta quer a sistemas enzimáticos quer a receptores nucleares ou de membrana, esteroides e não esteroides, incluindo neurotransmissores<sup>3</sup>.

A ligação a estes receptores resulta na estimulação ou inibição dos mecanismos de transcrição ou pós-transcrição celular, interferindo com a atividade dos canais de iões ou de proteínas que actuam como segundos mensageiros<sup>4</sup>.

Há várias razões que justificam a dificuldade da avaliação do impacto das ações dos DE na saúde, nomeadamente em idades pediátricas. Algumas substâncias com capacidade de disrupção endócrina, embora actualmente de uso proibido, por serem de lenta degradação podem ainda ser detetadas no meio ambiente, sendo o seu impacto na saúde proporcional à anterior utilização. A migração das populações leva a exposição a diferentes substâncias que mesmo dentro da mesma área geográfica pode variar com o estilo de vida.

Por outro lado, embora do ponto de vista experimental, seja comum avaliar o efeito de cada uma destas substâncias isoladamente, a realidade é que no ambiente elas co-existem, e é portanto expectável que possam interagir entre si, podendo o seu efeito ser aditivo, sinérgico ou de potenciação<sup>5</sup>.

Os DE encontram-se em abundância na cadeia alimentar, pelo que o ser humano é o candidato prioritário para a potencial ingestão e acumulação de produtos tóxicos<sup>3</sup>. Em geral, os DE têm uma baixa solubilidade na água, mas como são lipossolúveis, acumulam-se no tecido adiposo<sup>3</sup>.

A exposição a estas substâncias pode ocorrer também por inalação ou por contacto com a pele. Para qualquer tipo de exposição, as ações daí resultantes dependem da susceptibilidade individual, diferente e dependente das características genéticas de cada indivíduo.

Outras das dificuldades que se colocam ao investigar os efeitos da exposição a estes produtos tem a ver com o seu período de latência, que leva a que muitas manifestações só apareçam muito tardiamente.

É conhecido que existem determinadas fases na vida em que há uma maior vulnerabilidade à ação de mecanismos desreguladores cujos efeitos se podem manifestar muitos anos depois. É o que está implícito no conceito de “base fetal da doença adulta”, como foi sugerido por Barker em 1997, propondo que as fases de desenvolvimento fetal e neonatal são um período crítico de elevada susceptibilidade a fenómenos de desregulação que pode levar a mecanismos fisiopatológicos adaptativos que condicionam o futuro desenvolvimento<sup>6,7</sup>.

As substâncias com capacidade de disrupção endócrina existem no meio ambiente nos mais diversos contextos.

Os PCB (bifenilos policlorados) são compostos que foram intensamente utilizados na indústria até aos anos 70, data a partir da qual o seu uso foi proibido. Eram utilizados em óleos, lubrificantes e isolantes elétricos. Como resultado da sua utilização alargada e em quantidades maciças, ainda permanecem como um dos contaminantes ambientais mais importantes<sup>2</sup>.

As dioxinas são substâncias obtidas como subproduto de processamentos industriais, devido à combustão incompleta de compostos orgânicos. Provêm de incineradores, desperdícios de fábricas, combustão de petróleo e derivados. O ser humano está exposto às suas ações de modo direto através de emissões efetuadas



**Tabela 1**  
Disruptores Endócrinos - Origem e efeitos hormonais

Ftalatos	Cosméticos Embalagens de comida Brinquedos Materiais de construção Materiais médicos	Bloqueiam os receptores dos estrogénios
BPA	Agente estabilizante do plástico Recipientes e garrafas de plástico Material dentário Revestimento interno de latas Tintas, resinas	Efeitos estrogénicos
PCB	Transformadores e condensadores eléctricos Agente plastificante de tintas Subproduto de vários processos industriais	Ativação aos receptores dos estrogénios (efeito estrogénico/androgénico); Bloqueio dos receptores da tiroxina
Dioxinas	Subprodutos residuais formados na incineração de materiais com cloro, fabrico de metais, papel, herbicidas	Efeito antagonista dos estrogénios
Pesticidas	Amitrol  Atrazina  DDT	Inibe a síntese das hormonas tiroideas Ativação dos receptores de estrogénios e androgénios Efeito estrogénico, efeito anti-androgénico, interferência com síntese hormonal
	Metoxicloro	Efeito estrogénico

BPA: Bisfenol A; DDT: Diclorodifeniltricloroetano; PCB: Bifenilos Policlorados;

para a atmosfera e de modo indireto, por contaminação da água, solo e alimentos<sup>8</sup>.

Os ftalatos são utilizados na manufatura de plásticos flexíveis, pavimentos, tintas plásticas, vernizes e instrumentos médicos, como os cateteres. Existem também em sabões e champôs<sup>9</sup>. A sua semi-vida no organismo é de horas, sendo metabolizados rapidamente e excretados nas fezes e urina.

Os parabenos são substâncias usadas sobretudo em produtos de cosmética e alguns na indústria alimentar. A sua absorção por via cutânea é muito elevada, sendo metabolizados a nível hepático com os seus metabolitos a ser excretados na urina. Condicionam fenómenos de mimetismo estrogénico<sup>10</sup>.

Os compostos perfluorados são uma classe de substâncias que pelas suas propriedades são utilizadas na produção de materiais resistentes às manchas, óleos e água, sendo o constituinte de muitos produtos de combate ao fogo<sup>11</sup>. Um dos mais conhecidos destes compostos é o Teflon.

A genisteína é uma substância presente na soja e que tem ações idênticas às dos estrogénios.

O BPA é um monómero sintético utilizado na produção de plásticos policarbonados e é um dos produtos com maior utilização a nível mundial. Entra na composição de grande parte do plástico das garrafas de água que bebemos diariamente. Até muito recentemente, era também utilizado no fabrico dos biberões plásticos. É ainda um componente importante dos selantes dentários, assim como dos cateteres utilizados em medicina. A sua produção anual estima-se que seja de 1,7 milhões de toneladas.

Em países industrializados, foi demonstrada a presença de BPA em mais de 95% das pesquisas efectuadas em amostras de urina. Este produto tem a característica de contaminar em grande escala o ambiente por facilmente se separar das estruturas em que se encontra, quando há alterações da temperatura ou após a lavagem com substâncias ácidas ou alcalinas<sup>12</sup> (tabela 1).

Em 2007, foi publicado o relatório do consenso obtido por um grupo de investigadores da área de toxicologia ambiental sobre as ações do BPA. Nele é relatado como evidente que o efeito do BPA no

meio ambiente é detetado mesmo quando usado em doses muito baixas, que a sensibilidade a este agente varia ao longo da vida, que o BPA é capaz de induzir alterações epigenéticas e que está associado a alterações do sistema reprodutor e neuro-comportamental<sup>12</sup>.

Em 2010, a FDA emitiu um aviso alertando para os potenciais riscos associados à utilização do BPA, sobretudo sobre a sua utilização no fabrico de biberões e no revestimento de latas de leite para lactentes<sup>13</sup>.

Quando as substâncias com capacidade de disrupção endócrina começaram a ser utilizadas em larga escala pela indústria, as empresas efectuaram vários estudos de segurança. Estes foram efectuados com base no conceito de dose-efeito e pretendiam estabelecer um limite de dose para a sua utilização pelos seres humanos sem que houvesse o perigo de consequências nefastas. Verificou-se no entanto que, relativamente aos DE, o seu efeito não é linearmente dependente da dose. Com algumas destas substâncias, verifica-se que a curva dose-efeito é similar à letra U, com doses muito pequenas a serem capazes de ter efeitos idênticos a doses mais elevadas em termos de disfunção endócrina<sup>12</sup>.

As alterações ao normal desenvolvimento neuro-endócrino que se considera serem influenciadas pela presença de DE, podem ter nalguns casos um dimorfismo sexual mas em muitas situações não tem qualquer relação com o sexo do indivíduo.

## Efeitos no sexo feminino

### Puberdade precoce

Nas últimas décadas, tem sido referido na literatura uma tendência crescente para o aparecimento precoce de sinais de desenvolvimento pubertário, sobretudo no sexo feminino<sup>14</sup>.

A idade média do aparecimento da menarca era de 17 anos no século XIX e estabilizou nos 12-13 anos desde os anos 40 do século passado. Esta rápida evolução, ocorrida num tempo tão curto, seguramente que não tem a ver com modificações genéticas e estará provavelmente associada à modificação de factores ambientais e à melhoria das condições socioeconómicas.

Apesar da idade média do aparecimento da menarca se ter mantido estável ao longo das últimas décadas, surgiram recentemente na literatura trabalhos referindo, na população americana, o aparecimento de telarca em idades bastante mais jovens levantando-se a hipótese de haver uma "natural" antecipação do tempo da puberdade feminina.

Os mesmos resultados foram mais tarde referidos em estudos efectuados em alguns países europeus de certa forma confirmando que, actualmente, uma significativa parte das raparigas tem um desenvolvimento da glândula mamária em idades mais precoces. Como, apesar deste fenómeno, a idade média de aparecimento da menarca não se alterou de forma significativa é possível especular que este desenvolvimento mamário precoce possa traduzir apenas o prolongamento do tempo de desenvolvimento pubertário por variantes normais da puberdade<sup>15</sup>.

Os DE podem ser responsáveis pelo desenvolvimento precoce da glândula mamária através da sua capacidade de estimularem directamente os receptores estrogénicos ou condicionarem um aumento da sua sensibilidade aos baixos níveis de estrogénios circulantes. Há também a possibilidade de os DE promoverem a nível do SNC um aumento da secreção de Hormona Libertadora de Gonadotrofinas (GnRH)<sup>16</sup>.

Foi através de estudos experimentais em animais no laboratório que primeiro se estabeleceu uma relação de causa e efeito entre a ação de substâncias DE e alterações pubertárias. Em ratos, a administração de metoxicloro (pesticida utilizado na agricultura) durante a gestação, provocou um desenvolvimento pubertário precoce nos descendentes<sup>4</sup>. Este mesmo fenómeno foi obtido

utilizando nas mesmas condições o BPA, as dioxinas e a genisteína.

Nos seres humanos a demonstração desta associação entre DE e alterações pubertárias resultaram de estudos após exposições acidentais a grandes quantidades destas substâncias. Em 1973, cerca de 4000 indivíduos estiveram expostos acidentalmente a grandes quantidades de compostos de Bifenilos Polibrominados (PBB). Verificou-se que as suas filhas apresentaram uma idade mais precoce de aparecimento da menarca quando comparadas com as filhas de um grupo controlo que não tinha sofrido aquela exposição<sup>17</sup>.

Há vários artigos publicados na literatura demonstrando uma clara associação entre a ação de algumas substâncias com capacidade de DE, como por exemplo os ftalatos e o aumento da incidência de telarca precoce<sup>18,19</sup>.

Rasier et al.<sup>20</sup> mostraram que os ratos submetidos in útero à exposição a DDT tinham precocidade sexual. Pode-se especular que este mesmo fenómeno possa em parte ser observado no ser humano, onde se verifica um desenvolvimento sexual mais precoce nas meninas adoptadas em países desenvolvidos, mas provenientes de regiões em que a utilização do DDT como inseticida ainda é permitida. O mecanismo de ação do DDT que leva ao avanço da idade de início da puberdade ainda não é conhecido, mas pensa-se que possa ser estabelecido precocemente verificando-se mesmo quando se trata de uma exposição transitória<sup>20</sup>.

#### Síndrome de ovário poliquístico

A síndrome do ovário poliquístico, muito frequente nas adolescentes, caracteriza-se por anovulação persistente, oligomenorreia e hiperandrogenismo. Acompanha-se por vezes de uma insensibilidade parcial à ação da LH (Hormona Luteinizante), com cerca de metade dos casos apresentando também obesidade e resistência à insulina, fatores que aumentam o risco futuro de patologia cardiovascular<sup>21</sup>. A SOP é a principal causa de diminuição da fertilidade.

Em estudos com animais, verifica-se que os fetos submetidos in útero a elevadas concentrações de testosterona desenvolvem um fenótipo típico da SOP<sup>22</sup>. Pode-se conceber que no ser humano, se durante a gestação ocorrer uma exposição fetal a DE com potente efeito androgénico isso possa resultar, mais tarde, no aparecimento durante a puberdade, de manifestações clínicas da SOP. Um estudo efetuado em mulheres com diagnóstico da SOP mostrou que estas tinham níveis plasmáticos mais elevados de BPA do que as de um grupo controlo sem doença<sup>23</sup>.

#### Cancro da mama

O cancro da mama é uma das patologias cuja incidência tem vindo a aumentar nos últimos anos. É possível que a exposição a múltiplas substâncias ambientais seja um fator a considerar na sua etiologia, pois não é de esperar que haja alterações genéticas na população que ocorram em tão curto espaço de tempo. Os DE com actividade xenoestrogénica, que têm um efeito indutor da proliferação celular, podem aumentar o período de crescimento dos ductos e dos alvéolos da glândula mamária que ocorre normalmente durante o ciclo menstrual e estar implicados no desenvolvimento desta patologia<sup>24,25</sup>.

Estudos efetuados em pacientes com cancro da mama, permitiram demonstrar que alguns DE podem modificar a atividade enzimática celular, provocando um aumento do número de células com maior capacidade de metastização<sup>26,27</sup>.

As filhas de mulheres tratadas com DES durante a gravidez, ao atingirem a 5ª década de vida, apresentaram um risco 2,5 vezes superior de cancro da mama, fazendo pressupor que o efeito do

DES se estabeleceu ainda *in utero*<sup>24</sup>. Em estudos de experimentação animal obtiveram-se resultados idênticos como quando foram utilizadas as dioxinas<sup>26</sup> ou BPA<sup>27</sup>.

#### Sexo masculino

##### Infertilidade

Um dos efeitos mais frequentemente associado à ação dos DE é o aparecimento de oligospermia e diminuição da fertilidade. Várias substâncias têm sido apontadas como responsáveis deste fenómeno, nomeadamente os ftalatos<sup>12</sup> e o PCB<sup>28,29</sup>. Na Dinamarca, em 2009, foi efetuado um estudo que envolveu 105 homens, com uma idade mediana de 19 anos, e que demonstrou a existência de uma associação entre os níveis séricos de compostos perfluorados e menor concentração de espermatozoides<sup>30</sup>.

Meeker et al. avaliaram, em 190 homens seguidos numa consulta de infertilidade, a relação existente entre a exposição ao BPA e a presença de oligospermia e/ou lesão do ADN dos espermatozoides, verificando que havia uma correlação positiva entre ambos<sup>31</sup>.

##### Alterações da genitália

A criptorquidia e a hipospádia são alterações comuns do tracto genital masculino que afetam cerca de 2-9 e 0,2-1%, respetivamente, da população de recém-nascidos do sexo masculino. A sua incidência apresenta uma marcada variação geográfica com um aumento significativo em algumas regiões, pensando-se que possa ser devida à presença de ftalatos<sup>32</sup>.

A exposição prenatal a ftalatos e a BPA associa-se a adrenarca mais tardia; se a exposição a estas substâncias ocorrer na infância, determina diminuição dos níveis de testosterona na puberdade<sup>33</sup>.

#### Hiperplasia e cancro da próstata

O cancro da próstata é o tumor sólido mais frequente no sexo masculino. A hiperplasia benigna da próstata afeta cerca de 50% dos homens com mais de 50 anos<sup>34</sup>. Como a próstata possui receptores específicos para os estrogénios (ER  $\alpha$  e  $\beta$ ) é provável que os estrogénios possam estar envolvidos na etiologia destas patologias.

A avaliação efetuada em mais de 55.000 agricultores que utilizavam correntemente pesticidas permitiu demonstrar a existência de uma correlação entre a taxa de incidência do cancro da próstata e a exposição a um fungicida (metilbrometo). Para além desta também foi encontrada a mesma correlação para outros 6 pesticidas dos 45 que foram usados. Todos os pesticidas eram metabolizados através do sistema do citocromo P450 que diminui a eliminação de compostos com efeito estrogénico<sup>35</sup>.

Um mecanismo similar foi demonstrado aquando da exposição a compostos da família dos PCB e hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados (dioxinas, BPA e dibenzofuranos). Estes compostos inibem a atividade da sulfotransferase dos estrogénios, aumentando a sua biodisponibilidade para atuar nos órgãos alvo<sup>34</sup>.

Num trabalho publicado em 2006, Hardell et al. verificaram que no homem, os níveis de PCB no tecido adiposo se correlacionavam positivamente com a presença de cancro da próstata<sup>36</sup>.

Em vários estudos de experimentação animal foi encontrada uma relação positiva entre a exposição fetal a DES e o aparecimento de anomalias da próstata adulta, incluindo um risco aumentado de carcinogénese<sup>37</sup>.

As doses de BPA a que os seres humanos estão expostos regularmente em países desenvolvidos são capazes de induzir o crescimento celular em neoplasias prostáticas<sup>38</sup>. Em experimentação animal, a exposição fetal e/ou neonatal a doses baixas de BPA induz o aparecimento de atipia severa nas células

prostáticas do adulto mesmo exposto a níveis normais de estrogénios e testosterona<sup>39</sup>. Há um mecanismo epigenético, com metilação anormal do genoma em áreas que induzem ou freiam a transcrição de determinados genes responsáveis pelo aumento da carcinogénese<sup>39</sup>.

### Efeitos neuroendócrinos

O sistema neuro-endócrino que efectua a conexão entre o sistema nervoso central e os sistemas endócrinos, pode ser um dos alvos da ação disfuncional dos DE.

A influência da ação de disruptores endócrinos, é possível conceber que a sua alteração resultem repercussões na capacidade cognitiva, de aprendizagem ou de memória<sup>40</sup>.

Os DE podem atuar nos receptores hormonais presentes nas células hipotalâmicas e hipofisárias, que através de efeitos de retro-controlo positivo ou negativo, modulam a atividade hormonal destas áreas.

Como foram identificados numerosos neurotransmissores que são sensíveis à ação de disruptores endócrinos, é possível conceber que da sua alteração resultem repercussões na capacidade cognitiva, de aprendizagem ou de memória<sup>40</sup>.

Como alguns xenoestrogénios interferem com a atividade do transportador da dopamina é possível colocar a hipótese de haver uma ligação entre o recente aumento das patologias neurodegenerativas e a presença de disruptores endócrinos<sup>41</sup>.

### Efeitos sobre tiroide

A ação dos DE pode interferir com a entrada do iodo na célula tiroidea impedindo a normal síntese de hormonas tiroideas. É o mecanismo de ação do perclorato, químico presente de modo disseminado na água. A capacidade de interferência na síntese de hormona tiroidea surge mesmo com doses muito baixas, estando a sua concentração muito aumentada no leite materno<sup>42</sup>. O seu efeito depende da quantidade de iodo presente no ambiente, sendo que em áreas com depleção de iodo, a exposição simultânea a este químico desencadeia hipotireoidismo.

As isoflavonas, presentes na soja têm capacidade para bloquear a enzima tireoperoxidase (TPO). Labib et al. e Chorzay et al. publicaram artigos onde são relatados casos de bócio desencadeados pela ingestão de produtos, destinados à alimentação de lactentes, mas contendo soja<sup>43,44</sup>.

Os compostos com BPA têm a capacidade para bloquear os receptores da tiroxina<sup>45</sup>, o que poderá resultar no aparecimento de hipotireoidismo.

A ingestão pelo lactente, de fórmulas à base de soja, implica um maior risco de tiroidite auto-imune na segunda década de vida<sup>46</sup>. Os níveis séricos de PCB em jovens adolescentes estão também associados a um maior risco desenvolvimento de tiroidite auto-imune<sup>47</sup>.

### Obesidade e síndrome metabólico

Tem havido um aumento explosivo da incidência de excesso de peso e obesidade em todas as faixas etárias, mas de forma preocupante nas idades mais jovens. Isto tem sucedido tanto nos países desenvolvidos como naqueles em vias de desenvolvimento, nestes frequentemente coexistindo com malnutrição. Este surto de obesidade tem sido atribuído a modificações do estilo de vida, com uma ingestão alimentar excessiva associada a diminuição da atividade física.

Um dos primeiros investigadores a colocar a hipótese de existir uma associação entre a obesidade e a ação dos DE foi

**Tabela 2**

Disruptores endócrinos – Principais patologias associadas

Puberdade precoce central	Metoxicloro, BPA, dioxinas, bifenilos polibrominados, DDT, genisteína
Telarca precoce	Ftalatos
Síndrome de ovário poliquístico	BPA
Cancro da mama	DES, dioxinas, BPA
Infertilidade masculina	Ftalatos, PCB, compostos perfluorados, BPA
Alterações genitália	Ftalatos
Hiperplasia/cancro próstata	Fungicidas, pesticidas, PCB, dioxinas, BPA, dibenzofuranos, DES
Efeitos neuroendócrinos	PCB, pesticidas
Hipotiroidismo	Perclorato, isoflavonas, BPA
Obesidade e síndrome metabólico	BPA

BPA: Bisfenol A; DDT: Diclorodifeniltricloroetan.

Baillie-Hamilton PF que, em 2002, publicou um trabalho sobre a associação entre a obesidade e o marcado aumento na utilização de produtos químicos, a partir dos anos 1940-50<sup>48</sup>. Este autor cita numerosos estudos em que se relata a influência de vários produtos no desencadear de obesidade. A hipótese de explicação para este fenómeno então colocada passava pela alteração provocada no sistema hormonal, na sensibilidade aos neurotransmissores e na regulação do sistema nervoso simpático.

Existem alguns estudos epidemiológicos em que se refere que a exposição a DE durante algumas fases do desenvolvimento poderá estar associada ao aparecimento ulterior de excesso de peso e obesidade<sup>49</sup>.

Em experimentação animal, o aparecimento de obesidade na puberdade ou na idade adulta depende da quantidade, da duração e da idade da exposição fetal, a DES<sup>49</sup>.

A partir de 2006, foram publicados artigos que introduziram o conceito de “obesogénio” para caracterizar substâncias que regulam inapropriadamente o metabolismo lipídico promovendo a obesidade<sup>50</sup>.

Os níveis de BPA a que se encontra frequentemente exposto o ser humano, provocam um hiperinsulinismo transitório que se mantém ao longo do tempo, pode resultar em resistência à ação da insulina<sup>51</sup>. O BPA inibe a libertação de adiponectina, uma hormona libertada pelo adipócito e que promove uma melhor da resposta à insulina<sup>52</sup>.

O BPA tem capacidade para induzir a diferenciação de células 3T3-L1 (fibroblastos do rato, com capacidade para se diferenciarem em adipócitos) em adipócitos, assim como aumentar a sua proliferação<sup>53</sup>.

Existem alguns estudos que procuram relacional a exposição prenatal a DE com o Índice de massa corporal (IMC), em crianças e adolescentes. Delvaux et al. investigaram a relação entre a exposição prenatal a algumas destas substâncias, nomeadamente cádmio, e a composição corporal de crianças entre os 7-9 anos de idade, tendo encontrado uma relação negativa entre ambos, no sexo feminino. Ou seja, quanto maior a exposição prenatal a cádmio, menor o IMC e o perímetro abdominal. Isto demonstra a existência de uma relação entre a exposição prenatal a DE e a influência tardia destes sobre a composição corporal<sup>54</sup>.

Sabe-se que a desregulação das hormonas com ação neuroepéptica interfere com a atividade neuronal hipotalâmica, podendo levar à obesidade. Este equilíbrio é facilmente alterado pela presença de DE que apresentem capacidade estrogénica, através de uma interferência a nível do comportamento alimentar e da própria taxa metabólica basal. Uma outra via de influência dos DE pendese com a sua ligação ao sistema de endocanabinoides, provocando um efeito orexigenico central<sup>52</sup> (tabela 2).

## Conclusões

Esta é uma área do conhecimento médico importante, atual e original e que se encontra em franca expansão. É um dado adquirido que existem substâncias que funcionam como contaminantes ambientais e que são susceptíveis de causarem doença.

Muitas das patologias implicadas têm mecanismos epigenéticos que se estabelecem precocemente “*in utero*” ou logo após o nascimento, sendo fundamental aplicar aquilo que é referido nos Consensos da “*Endocrine Society*”, como o princípio da precaução. As populações devem ser informadas acerca destes temas e tomadas medidas, quer a nível governamental quer individual de modo a tentar minimizar o efeito, ainda parcialmente desconhecido, da exposição a estas substâncias.

Em 2011 a *European Society for Paediatric Endocrinology* (ESPE) e a *Pediatric Endocrine Society* (PES) publicaram um “*Call For Action Statement*” com o objetivo de alertar os endocrinologistas pediátricos para o papel dos disruptores endócrinos na sua actividade clínica e de investigação<sup>55</sup>.

É imperioso aumentar o grau de conhecimento médico relativo à presença deste tipo de substâncias no nosso país. Na actividade clínica diária e perante algumas situações patológicas, é necessário considerar a influência de poluentes ambientais, e ponderar a sua pesquisa e doseamento.

Não é demais salientar o papel do Pediatra neste contexto, devendo assumir um papel ativo na sociedade, de modo a difundir estes conhecimentos no âmbito da saúde infantil e juvenil. A principal recomendação que emerge dos Consensos referidos anteriormente é a necessidade de informar a população acerca do risco devido à presença destas substâncias, implicando alterações de comportamentos e medidas de evicção, sobretudo no feto e na criança.

## Responsabilidades éticas

**Proteção de pessoas e animais.** Os autores declaram que para esta investigação não se realizaram experiências em seres humanos e/ou animais.

**Confidencialidade dos dados.** Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de pacientes.

**Direito à privacidade e consentimento escrito.** Os autores declaram que não aparecem dados de pacientes neste artigo.

## Conflitos de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## Bibliografia

- Sorensen K, Mouritsen A, Aksglaede L, Hagen CP, Mogensen SS. Recent secular trends in pubertal timing: implications for evaluation and diagnosis of precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2012;77:137–45.
- Sonnenschein C, Soto A. Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6:363–70.
- Diamanti-Kandaraki E. Endocrine-Disrupting chemicals: an Endocrine Society Scientific Statement Endocrine. *Reviews*. 2009;30:293–342.
- Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D. Definition, classification and mechanism of action of endocrine disrupting chemicals. *Hormones*. 2010;9:1–15.
- Crews D, Putz O, Thomas P, Hayes T, Howdeshell K. Animal models for the study of the effects of mixtures, low doses, and the embryonic environment on the action of endocrine disrupting chemicals SCOPE/IUPAC. *Project Implications of endocrine active substances for human and wildlife*. 2003;75:2305–20.
- Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction*. 2002;17:2839–41.
- Barker DJP. Maternal Nutrition Fetal Nutrition, and Disease in Later Life. *Nutrition*. 1997;13:807.
- Alves C, Flores L, Cerqueira T, Toralles M. Exposição ambiental a interferentes endócrinos com actividade estrogénica e sua associação com distúrbios puberais em crianças. *Cad Saúde Publica*. 2007;23:1005–14.
- Barlow NJ, Foster PM. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to phthalate. *Toxicol Pathol*. 2003;31:397–410.
- Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U. Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites. *Reprod Toxicol*. 2010;30:301–12.
- Trojanowicz M, Koc M. Recent developments in methods for analysis of perfluorinated persistent pollutants. *Mikrochim Acta*. 2013;180:957–941.
- Saal F, Akingbemi B, Belcher S, Blrbaum L, Crain D, Eriksen M. Chapel Hill Bisphenol A Expert Panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive Toxicol*. 2007;24:1–26.
- Myers JP, Saal F, Akingbemi B, Arizono K, Belcher S, Colborn T. Why Public Health Agencies cannot depend on Good Laboratory Practices as a criterion for selecting data: the case of Bisphenol. *Environ Health Perspect*. 2009;117:309–15.
- Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev*. 2003;24:668–93.
- Toppari J, Juul A. Trends in puberty timing in humans and environmental modifiers. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;324:39–44.
- Ozen S, Darcan S. Effects of environmental endocrine disruptors on pubertal development. *J Clin Res Ped Endo*. 2011;3:1–6.
- Blanck HM, Marcus M, Tolbert PE, Rubin C, Henderson AK, Hertzberg VS. Age at menarche and Tanner stage in girls exposed in utero and postnatally to polychlorinated biphenyl. *Epidemiology*. 2000;11:641–7.
- Buck L, Gray LE, Marcus M, Ojeda SR, Pescovitz OH, Witchel SF. Environmental factors and puberty timing: expert panel research needs. *Pediatrics*. 2008;121:S192–207.
- Doherty L, Bromer J, Zhou Y, Aldad T, Taylor H. In utero exposure to DES or BPA-A increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Horm Cancer*. 2010;1:146–55.
- Rasier G, Parent AS, Gerard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP. Early maturation of GnRH secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biol Reprod*. 2007;77:734–42.
- The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long term health risks related to PCOS. *Hum Reprod*. 2004;19:41–7.
- Dumesic DA, Abbott DH, Padmanabhan V. PCOS and its developmental origins. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007;8:127–41.
- Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor BPA, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocr J*. 2004;51:165–9.
- Palmer JR, Wise LA, Hatch EE, Troisi R, Titus-Ernstoff L, Strohshitter W. Prenatal DES exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1509–14.
- Soto A, Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C. Does breast cancer start in the womb? *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008;102:125–33.
- Brown NM, Manzanillo PA, Zhang JX, Wang J, Lamartiniere CA. Prenatal TCDD and predisposition to mammary cancer in the rat. *Carcinogenesis*. 1998;19:1623–9.
- Murray TJ, Maffini MV, Ucci AA, Sonnenschein C, Soto AM. Induction of mammary gland ductal hyperplasia and carcinoma in situ following fetal. BPA exposure *Reprod Toxicol*. 2007;23:383–90.
- Hauser R, Chen Z, Pothier L, Ryan L, Alstshul L. The relationship between human semen parameters and environmental exposure to PCB and DDE. *Environ Health Perspect*. 2003;111:1505–11.
- Daling JW, Moonen EJ, Dumoulin JC, Evers JL, Garaedts JP, Kelnjans JC. Decreased human semen quality and PCB in blood. *Hum Reprod*. 2002;17:171–89.
- Joensen UN, Bossi R, Jeffers H, Jensen AA, Skakkebaek NE, Jorgensen N. Do perfluoroalkyl compounds impair human semen quality? *Environ Health Perspect*. 2009;117:923–7.
- Meeker J, Ehrlich S, Toth T, Wright D, Calafat A <ETAL>. Semen quality and sperm DNA damage in relation to urinary BPA-A among men from an infertility clinic. *Reprod Toxicol*. 2010;30:532–9.
- Toppari J, Virtanen HE, Main KM, Skakkebaek NE. Cryptorchidism and hypospadias as a sign of testicular dysgenesis syndrome (TDS): environmental connection. *Birth defects res a clin mol teratol*. 2010;88:910–9.
- Ferguson K, Peterson K, Lee J, Mercado-Garcia A, Blank-Goldenberg C, Tellez-Rojo M, Meeker J, et al. Prenatal and peripubertal phthalates and bisphenol A in relation to sex hormones and puberty in boys. *Reprod Toxicol*. 2014;47:70–6.
- Prins GS. Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocr Relat cancer*. 2008;15:644–9.
- Van Maele-Fabry G, Libotte V, Willems J, Lison D. Review and meta-analysis of risk estimates for prostate cancer in pesticide manufacturing workers. *Cancer causes control*. 2006;17:353–73.
- Hardell L, Andersson SO, Carlberg M, Bohr L, van Bavel B, Lindström G, et al. Adipose tissue concentrations of persistent organic pollutants and the risk of prostate cancer. *J Occup Environ Med*. 2006;48:700–7.
- Aray Y, Mori T, Suzuki Y, Bern HA. Long term effects of perinatal exposure to sex steroids and DES on the reproductive system of male mammals. *Int Rev Cytol*. 1983;84:235–68.
- Wetherill YB, Hess-Wilson JK, Comstock CE, Shah SA, Buncher CR, Sallans L, et al. BPA facilitates bypass of androgen ablation therapy in prostate cancer. *Mol cancer Ther*. 2006;5:3181–90.

39. Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prind GS. Developmental exposure to estradiol and BPA increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase Type 4 variant 4. *Cancer Res.* 2006;66:5624–32.
40. Gore AC, Wu TJ, Oung T, Lee JB, Woller MJ. A novel mechanism for endocrine-disrupting effects of PCB: direct effects on GnRH neurons. *J Neuroendocrinol.* 2002;14:814–23.
41. Alyea R, Watson CS. Differential regulation of dopamine transporter function and location by low concentrations of environmental estrogens and 17 beta estradiol. *Environ Health Perspect.* 2009;117:778–83.
42. Pearce EN, Leung AM, Blount BC, Bazrafshan HR, He X, Pino S, et al. Breast milk iodine and perchlorate concentrations in lactating Boston area women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:1673–7.
43. Chorazy PA, Himelhoch S, Hopwood NJ, Greger NG, Postellon DC. Persistent hypothyroidism in an infant receiving a soy formula: case report and review of the literature. *Pediatrics.* 1995;96:148–50.
44. Labib M, Gama R, Wright J, Marks V, Robins D. Dietary maladvice as a cause of hypothyroidism and short stature. *Brit Med J.* 1989;298:232–3.
45. Moriyan K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M<ETAL>. Thyroid hormone action is disrupted by BPA as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:5185–90.
46. Fort P, Moses N, Fasano M, Goldberg T, Lifshitz F. Breast and soy formula feedings in early infancy and the prevalence of autoimmune thyroid disease in children. *J Am Coll Nutr.* 1990;9:164–7.
47. Schell LM, Gallo MV. Relationships of putative endocrine disruptors to human sexual maturation and thyroid activity in youth. *Physiology & Behaviour.* 2010;99:246–53.
48. Baillie-Hamilton PF. Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med.* 2002;8:185–92.
49. Vasiliu O, Cameron L, Gardiner J, Deguire P, Karmaus W. PBB PCB, body weight and the incidence of adult-onset diabetes mellitus. *Epidemiology.* 2006;17:352–9.
50. Newbold R, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Jefferson WN. Perinatal exposure to environmental estrogens and the development of obesity. *Mol Nutr Food Res.* 2007;51:912–7.
51. Grunn F, Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology.* 2006;147:S50–5.
52. Elobeid MA, Allison DB. Putative environmental- endocrine disruptors and obesity: a review. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2008;15:403–8.
53. Williams CM, Kirkham TC. Observational analysis of feeding induced by delta 9-THC and anandamide. *Physiol behave.* 2002;76:241–50.
54. Delvaux I, Cauwenberghe J, Hond E, Schoeters G, Govarts E, Nelen V, Larebeke N, Sioen I, et al. Prenatal exposure to environmental contaminants and body composition at age 7-9 years. *Environmental Research.* 2014;132:24–32.
55. Skakkebaek NE, Toppaz J, Soder O, Gordon CM, Divali S, Draznin M. The exposure of fetuses and children to endocrine disrupting chemicals: a European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) and Pediatric Endocrine Society (PES) call to action statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96:3056–8.



## 1.3. Factores Preditivos de Complicações

Tendo em conta a idade cada vez mais jovem em que as crianças são diagnosticadas com DMT1, quando atingem a idade adulta, muitas delas foram já expostas a mais de duas décadas de hiperglicemia e instabilidade glicémica<sup>74</sup>. Isto determina um risco de complicações associadas, de etiologia micro e macrovascular<sup>1</sup>. O bom controlo glicémico, que se traduz como uma adequada HbA1c e pequena instabilidade glicémica pode reduzir a incidência de doença cardiovascular em 42%<sup>75,76</sup>.

A ADA (*American Diabetes Association*) e a ISPAD (*International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes*) recomendam assim uma HbA1c <7,5% para as crianças e jovens com menos de 18 anos<sup>77,78</sup>.

As complicações microvasculares como a retinopatia, nefropatia e neuropatia diabéticas são sobejamente conhecidas, embora muito se discuta ainda acerca dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes às mesmas. Sabe-se, no entanto, que a hiperglicemia provoca alterações da retina, nervos periféricos e glomérulos renais<sup>1</sup>. As células presentes nestes órgãos são particularmente sensíveis à presença de hiperglicemia, com resultante sobreprodução de superóxido e consequente stresse oxidativo. As complicações macrovasculares, no entanto, apesar de frequentemente menos faladas, não são menos importantes. Na realidade, o risco cardiovascular inicia-se na infância, e estima-se que cerca de 14-45% das crianças com DMT1 apresentem mais de dois factores de risco cardiovascular<sup>79</sup>.

Muitas das crianças com DMT1 apresentam doença cardiovascular sub-clínica, com aumento da rigidez arterial, maior espessura da íntima carotídea e disfunção endotelial, o que precede o aparecimento de aterosclerose<sup>80</sup>.





## 1.4. Factores de Risco de Doença Cardiovascular

### 14.1. Hiperglicemia

Há numerosos factores de risco de patologia cardiovascular reunidos nos diabéticos. Um dos mais importantes, e conhecido desde a publicação do DCCT é naturalmente a hiperglicemia<sup>86</sup>. No estudo SEARCH, constatou-se a presença de níveis elevados de colesterol total, LDL e triacilglicerídeos em 1680 crianças com DMT1 e relacionados com o valor de HbA1c<sup>87</sup>. Em 2014, Eltayeb mostrou a relação entre um mau controlo glicémico, patente numa HbA1c elevada, e a disfunção endotelial<sup>88</sup>.

### 14.2. Hiperlipidemia

Há bastante investigação que visa avaliar a presença de alterações do perfil lipídico com o acréscimo do risco cardiovascular. Em 2009, e no âmbito do estudo SEARCH foram apresentados os perfis lipídicos de crianças com e sem DMT1, mostrando que 15% das crianças diabéticas tinham colesterol elevado, nomeadamente LDL-colesterol, o que acarreta um maior risco de doença cardiovascular<sup>89</sup>. Outros artigos mostram resultados idênticos.

Em 2015, Bjornstad defendeu a utilização da determinação de apolipoproteína-B para avaliação do risco cardiovascular, uma vez que encontrou que diabéticos com APO-B mais elevada apresentavam também maior rigidez arterial. Isto em indivíduos com perfis lipídicos idênticos<sup>90</sup>.

Embora se discutam frequentemente os perfis lipídicos solicitados regularmente no seguimento de crianças e jovens diabéticos, desconhece-se qual o seu perfil de ácidos gordos. No entanto, este parece ser importante, dado encontrar-se relação entre alguns destes e uma actividade pró-inflamatória.<sup>91</sup> Como tal, pretendeu-se avaliar o conteúdo de ácidos gordos livres em crianças diabéticas.

### 14.3. Stresse Oxidativo

Na presença de hiperglicemia e hiperlipidemia, entre outros fatores, como o tabagismo, a produção de ROS (*Reactive Oxygen Species*) aumenta e ultrapassa a resposta endógena de antioxidantes<sup>92</sup>. O stresse oxidativo aumenta a oxidação de várias moléculas, entre as quais, LDL e promove a disfunção endotelial<sup>93,94</sup>. A retenção de partículas LDL na parede vascular é considerado o primeiro passo da aterogénese<sup>95</sup>. Seguidamente, o LDL é oxidado pelas células vasculares e desencadeia a produção de MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*) e M-CSF (*Macrophage Colony Stimulating Factors*)<sup>96</sup>. O stresse oxidativo é assim um importante fator de risco para a formação de aterosclerose<sup>92</sup>.

As ROS podem ser disfuncionais ou protetoras. O anião superóxido ( $O_2^-$ ) reage com o monóxido de azoto (NO), originando peroxinitrito ( $ONOO^-$ )<sup>97</sup>. Este, determina uma diminuição da produção de NO protetor. Também induz oxidação lesiva para a vasculatura<sup>97</sup>. Outro produto resultante da molécula de superóxido, o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), promove a hipertrofia das células do músculo liso vascular, ativa metaloproteínases e inibe a atividade da síntese do monóxido de azoto endotelial<sup>98</sup>.

Sabe-se que o endotélio vascular tem um papel fundamental na manutenção da homeostasia cardiovascular<sup>97</sup>. Quando ocorre disfunção endotelial, existe uma menor vasodilatação dependente do endotélio (associada a menor biodisponibilidade de NO e prostaciclina), assim como um estado inflamatório e pró-trombótico<sup>99</sup>. Os antioxidantes, individualmente ou combinados, podem modular a atividade da síntese do NO, e diminuir a geração de radicais livres, assim como promover a sua eliminação, diminuindo o stresse oxidativo e, consequentemente, a disfunção endotelial<sup>100</sup>.

Neste projeto, procurou-se avaliar a presença de fatores antioxidantes em crianças com DMT1.

## 1.5. Manifestações de Doença Cardiovascular Sub-Clínica

### 1.5.1. Rigidez Arterial

Uma forma de pesquisar a existência de doença cardiovascular é medir a rigidez arterial. Este é um parâmetro que se sabe estar associado com uma maior propensão para eventos cardiovasculares adversos nos adultos<sup>81</sup>. A velocidade de onda pulso carotídeo-femural (VOP) é considerada o *gold-standard* para medir a rigidez arterial<sup>82</sup>. Outra variável avaliada é o Índice de aumento@75 bpm (AI75), sendo esta influenciada não só pela rigidez arterial, mas também, pela frequência cardíaca<sup>82</sup>.

Há muita investigação nesta área, mas de facto ainda com resultados contraditórios. Em 2004, Haller e colaboradores compararam 98 crianças diabéticas com 57 controlos e encontraram um valor de AI75 superior nas primeiras. No entanto, tratava-se de um grupo de crianças diabéticas com deficiente controlo metabólico<sup>83</sup>. No estudo SEARCH, foram comparados 535 jovens com DMT1 com 241 controlos. Mais uma vez encontrou-se maior rigidez arterial nos diabéticos. No entanto, tratava-se de jovens com idade média de 14,6 anos  $\pm$  3,3 e também com um controlo metabólico inferior ao desejável<sup>84</sup>. O estudo *SEARCH for Diabetes in Youth* é um projeto multicêntrico americano fundado pelo CDC (*Centers for Disease and Prevention*) e NIDDK (*National Institute of Diabetes and Kidney Diseases*) e que se destina a desenvolver investigação sobretudo em Diabetes tipo 1 em idade pediátrica. Teve início em 2000 e irá continuar até, pelo menos, 2020.

Mas há também quem encontre resultados contrários. Assim, e de acordo com o que foi publicado em 2016 pela equipa de Cambridge, não foram encontradas diferenças na rigidez arterial entre crianças diabéticas e controlos<sup>85</sup>. Assim, considerou-se importante avaliar a presença da rigidez arterial em crianças e jovens com DMT1.



Capítulo II

# Objetivos



- Avaliar o impacto de alguns disptores endócrinos, como o BPA, ftalatos e pesticidas sobre o desencadear de DMT1 em crianças pré-púberes (Capítulo 3.1);
- Pesquisar a relação entre a exposição a disruptores endócrinos e um agravamento do controlo metabólico nas crianças com DMT1 (Capítulo 3.1);
- Determinar o perfil de ácidos gordos em crianças recém diabéticas e com DMT1, comparando com crianças saudáveis (Capítulo 3.2.1.1);
- Avaliar a presença de anti-oxidantes nas crianças diabéticas (Capítulo 3.2.1.2);
- Procurar manifestações subclínicas de complicações macrovasculares em crianças e jovens com DMT1 (Capítulo 3.2).





## Capítulo III

# Resultados e Discussão

51 

---

 Disruptores Endócrinos

79 

---

 Factores de Risco Preditivo de Complicações



## 3.1. Disruptores Endócrinos

### 3.1.1. BPA

O BPA é um dos monómeros sintéticos mais extensamente utilizados na produção de plásticos policarbonados e por isso mesmo, tem impacto ambiental significativo<sup>101</sup>. Os seres humanos estão expostos a esta substância desde 1957, quando se deu início à sua produção em massa<sup>102</sup>.

Em 2015, foram produzidos cerca de 4,5 milhões de toneladas de BPA<sup>102</sup>. A quantidade da sua produção tem vindo mesmo assim a aumentar, e estima-se que este ano (2017) tenha ultrapassado as 5,4 milhões de toneladas<sup>103</sup>.

O BPA encontra-se nas garrafas de plástico, embalagens de alimentos, biberões, revestimento de latas de produtos alimentares, aparelhos médicos e dentários, objectos eletrónicos, lentes dos óculos e até em revestimento de tanques e condutas de água<sup>104,105</sup>. Alimentos/refeições enlatadas são das fontes mais importantes de contacto do ser humano com esta substância, com valores idênticos de contaminação encontrados em diferentes países<sup>106</sup>.

Para além da ingestão, outra forma de exposição a este produto é através da pele. Assim, foi demonstrado que o papel usado nos recibos dos supermercados e das caixas multibanco, também ele revestido de BPA, é uma fonte de contacto importante, bastando segurar o mesmo por cerca de 5 segundos, para se manter em circulação durante aproximadamente 2 horas<sup>107,108</sup>. O BPA também é utilizado na constituição do celofane, o qual, como se sabe, é um material amplamente destinado ao uso alimentar<sup>109</sup>.

O BPA e vários dos seus análogos (bisfenol-F - BPF e o bisfenol-S - BPS) foram encontrados em cerca de 75% das amostras analisadas de múltiplos alimentos, nomeadamente, fruta, vegetais, cereais,

laticínios, bebidas, óleos, peixe, marisco e carne<sup>110</sup>. Também foi encontrado no pó da casa, sendo esta uma importante fonte de contaminação em idade pediátrica<sup>111</sup>.

Devido à sua presença maciça em tantos produtos e com tantas aplicações na vida diária, o BPA é considerado um contaminante ambiental ubiqüitário<sup>112</sup>. Apesar da possibilidade de diversas fontes de contacto e exposição, a principal forma de contaminação do ser humano é através da alimentação<sup>106</sup>.

A informação que tem vindo a público relativamente a esta contaminação ambiental tem feito com que na Europa e nos Estados Unidos da América se tenha vindo a tentar diminuir, pelo menos parcialmente, a sua utilização. Assim, o consumo europeu de policarbonato foi de 30% em 2010 e 25% em 2015, verificando-se uma tendência idêntica nos EUA<sup>105</sup>. No entanto, na China, a sua utilização permanece extremamente elevada e com a tendência inversa<sup>105</sup>. Isso irá sem dúvida repercutir-se no resto do mundo, tendo em conta a actual globalização do mercado.

Tem havido também uma tentativa de substituir este químico por outros análogos, dado o facto de muitos consumidores terem já a noção do potencial risco da utilização do BPA. No entanto, a utilização preferencial dos seus análogos, (BPS e BPF) em detrimento da molécula original, não parece a melhor solução, uma vez que estes químicos apresentam efeitos similares a nível celular<sup>113</sup>.

A Agência de Proteção Ambiental (EPA) nos EUA estabeleceu, em 1988 uma ingestão diária tolerável de BPA até 50 µg/kg<sup>114</sup>. Já em 2015, a Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (EFSA) reduziu esta quantidade para 4 µg/kg/dia, estabelecendo uma dose oral de referência do BPA na água de consumo até 100 µg/l<sup>115</sup>. Em Dezembro de 2017, na página desta instituição, o mesmo painel prevê reavaliar, a partir de Janeiro de 2018, as eventuais consequências de contacto com este produto químico.

A maior parte dos estudos em seres humanos, detectou a presença deste composto no sangue, embora em concentrações muito variáveis<sup>116</sup>. No entanto, quando se analisaram outros tecidos, que não o sangue, encontraram-se concentrações bastante mais elevadas, nomeadamente, na placenta, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico, ou leite materno<sup>29,117,118,119</sup>.

Na urina, o BPA foi encontrado em 52-100% das amostras, confirmando uma exposição ubiqüitária a este químico<sup>116</sup>. A alteração endócrina induzida pelo BPA tem múltiplos mecanismos de ação possíveis. Entre esses, e no que respeita a este projeto, importa salientar quais os que poderão ter impacto relativamente à homeostasia da glicose.

O BPA tem alguma semelhança com a molécula de 17 beta-estradiol, e embora não possua um anel esteroide completo, apresenta propriedades químicas similares, assim como a capacidade para se ligar, ainda que fracamente, aos recetores de estrogénios<sup>120</sup>. Assim, o BPA tem a possibilidade de se ligar aos recetores de estrogénios ER-alfa e ER-beta<sup>121</sup>. Também se liga a outro recetor estrogénico, ERR-gama, um recetor estrogénico nuclear<sup>126</sup>. Pensa-se que o seu efeito de indução de intolerância à glicose e aumento da resistência à insulina se estabeleça através da ligação a estes recetores estrogénicos, embora ainda não esteja totalmente comprovado que assim seja.

De facto, para além deste mecanismo, sabe-se que o BPA consegue exercer o seu efeito por outros mecanismos, como através de vias não genómicas<sup>122</sup>. Estes sistemas são formas de sinalização celular ligadas à membrana e com um tempo de resposta mais rápido do que a induzida pelos recetores nucleares, assim como uma resposta a menores quantidades de ligando<sup>123</sup>.

Uma das questões que se coloca quando se estuda a contaminação ambiental com o BPA é o ter vindo a ser demonstrado que a curva de ação deste químico não é monotónica, mas sim em U invertido<sup>124</sup>. Isto foi particularmente comprovado em estudos de experimentação animal, em que se encontraram efeitos endócrinos importantes com a utilização de baixas doses de BPA, contrariamente ao que sucede quando se expuseram os animais a doses elevadas deste composto<sup>124</sup>.

Neste projecto pretendeu-se analisar a presença de BPA em crianças diabéticas, em crianças com diabetes inaugural e comparar com crianças saudáveis, de modo a tentar estabelecer uma associação entre a presença desta substância e o desencadear de DMT1, assim como investigar uma eventual relação entre a exposição a este químico e um pior controlo metabólico, dado haver uma redução da tolerância à glicose e insulinoresistência desencadeada por este composto.

## **Material e Métodos**

### Amostra do estudo

De um total de 302 doentes seguidos na Unidade de Endocrinologia Pediátrica foram selecionados aleatoriamente 35 doentes (14 masculinos e 21 femininos), todos com idades compreendidas entre os 6 e os 12 anos e pré-púberes. Todos apresentavam IMC < Pc 85, de acordo com curvas da OMS, tendo sido diagnosticados há mais de 6 meses. Nenhum apresentava complicações microvasculares e não utilizava qualquer outra medicação para além da insulinoaterapia. Todos utilizavam esquema funcional de insulina, com insulina glargina e análogos rápidos (lispro, asparto ou glulisina). No mesmo período de tempo, foram incluídas todas as crianças da mesma idade e com o diagnóstico de diabetes

há menos de 6 meses, as quais constituíram o grupo de diabetes inaugural (n=13). O grupo controlo (n=19) incluiu crianças saudáveis seguidas na consulta de Cirurgia Pediátrica e internadas para procedimentos cirúrgicos menor (correção de orelhas de abano, fimose, polegar em mola, por exemplo).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Centro Hospitalar de S João e todos os pais/responsáveis parentais assinaram um consentimento informado antes do início do estudo.

**Tabela 1:** Caracterização da amostra.

	Feminino/ Masculino	Idade (Anos) (min-max; média)	HbA1c (%) (min-max; média)
<b>DMT1 (n=35)</b>	21/14	3,2 - 11,6; 7,8	6,3 - 12,5; 8,4
<b>Diabetes inaugural (n=13)</b>	7/6	2,2 - 10,8; 7,6	8,2 - 14; 10,1
<b>Controlos (n=19)</b>	7/12	2,4 - 10,3; 6,9	

Foram escolhidas crianças com IMC < Pc85 de modo a tentar que houvesse uma menor deposição no tecido adiposo, uma vez que este composto apresenta alguma lipofilia<sup>125</sup>. Escolheram-se crianças pré-púberes no sentido de eliminar o viés que poderia ser induzido pela existência de alguma insulino-resistência que se sabe estar presente a partir do início do desenvolvimento sexual.

#### Preparação da amostra

**Desconjugação:** A 3 mL de urina adicionou-se 5 µL da enzima β-glicuronidase/Arilsulfatase e colocou-se numa incubadora a 37°C durante a noite. Após a desconjugação, adicionou-se 3 mL de água desionizada com 5 µL de ácido fórmico. De seguida, colocou-se a amostra 30 min nos ultrassons e centrifugou-se a 3000 rpm durante 5 min. Separou-se o sobrenadante ao qual se adicionou 180 µL de padrão interno BPA13C12 a 1000 µg/L.

#### Extração SPE

Condicionou-se o cartucho de SPE, Strata X polymeric reversed phase, com 3 mL de metanol e 3 mL de água desionizada com 5 µL de ácido fórmico. Passou-se a amostra e 3 mL de solução (30/70) MeOH/ água desionizada com 5 µL de ácido fórmico. Deixar secar em vácuo por 1 hora. Eluir com 6 ml de acetato de etilo com 5% de ácido fórmico. Evaporou-se em corrente de azoto até à secura.

### Derivatização

Adicionar 100 µL de BSTFA +1%TCMS ao vial seco. Colocou-se em banho a 80°C por 30 minutos. Injetar o conteúdo em Cromatografia Gasosa com Espectrómetro de massa.

### Análise cromatográfica

O equipamento de cromatografia a gás utilizado foi um *Thermo Trace-Ultra* com detector “*ion trap mass*” Thermo Polaris. A coluna capilar utilizada era uma ZB-XLB de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme.

### Programação de temperatura

Temperatura inicial de 90°C (1 min), aquecimento a 15°C/min até 250°C (1 min), aumento de 20°C/min até 255°C (5 min); aumento 10°C/min até 270°C (1 min); aumento 20°C até 290°C (2 min).

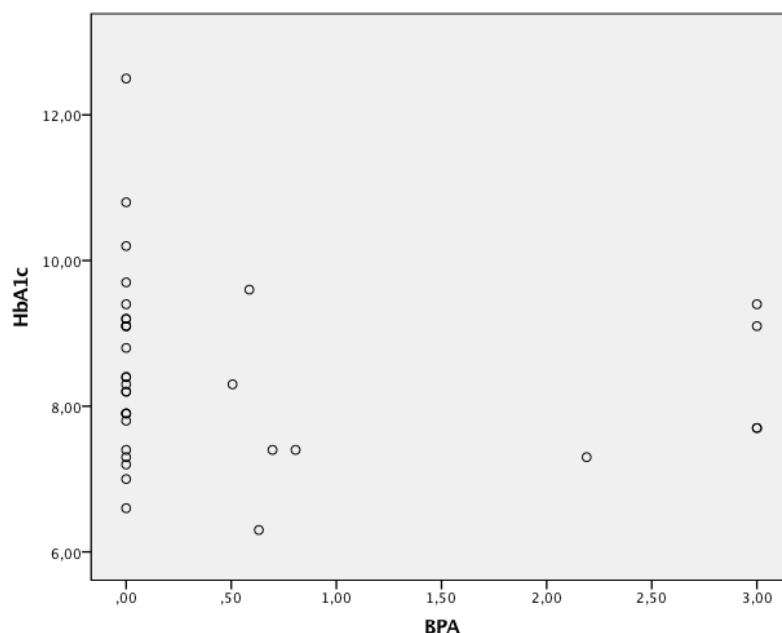
Tempo total da corrida foi de 23,5 minutos. O gás de arraste foi o hélio a um caudal de 1 mL/min. O injetor operou a 250°C no modo sem divisão de fluxo (*Splitless*). O espectrómetro de massa operou com impacto electrónico com energia de 70 eV. As temperaturas da fonte de iões e da interface GC/MS estiveram a 250°C e a 270°C °C, respetivamente. A deteção foi realizada no modo SIM para o BPA (357, 372) e para o BPA13C12 (369, 384). Foi utilizado o programa *Xcalibur* da *Thermo Finnigan* (EUA) para aquisição dos dados do GC/MS.

## Resultados

**Tabela 2:** Relação entre grupo de diabetes, diabetes inaugural e controlos e BPA < LOD; BPA doseável, e BPA >> 3ng/ml.

	< LOD N (%)	Doseável N (%)	>>3 ng/ml
<b>DMT1 (n=35)</b>	25 (71,4)	6 (17,1)	4 (11,4)
<b>Diabetes inaugural</b>	10 (76,9)	1 (7,7)	2 (15,4)
<b>Controlos</b>	6 (31,6)	13 (68,4)	0 (0)

Há uma associação significativa entre os grupos DMT1 e diabéticos inaugurais *versus* controlos e ter BPA <LOD, doseável e >>3 ( $p<0,001$  – teste exato de *Fisher*).



**Figura 1:** Relação nas crianças com DMT1 (n=35) entre HbA1c e BPA.

Não há correlação significativa entre BPA e HbA1c (coeficiente de correlação de *Spearman* = -0,197 ( $p=0,258$ ). A mediana de HbA1c foi de 8,4 (min=6,6 e max=12,5) para BPA<LOD; 7,4 (min=6,3 e max=9,6) para valores de BPA doseáveis e 8,4 (min=7,7 e max=9,4) para BPA>>3. Estas diferenças não são significativas ( $p=0,198$ , *Kruskal-Wallis*).

A análise destes resultados torna evidente que, contrariamente ao relatado na literatura, uma percentagem significativa das crianças diabéticas, no presente estudo, não terão BPA doseável na urina. De facto, em cerca de 71% das amostras de urina de crianças com diabetes, os níveis de BPA foram inferiores ao *Limit Of Detection* (LOD). Também nas crianças recém-diagnosticadas com diabetes, só cerca de 23% apresentavam valores de BPA mensuráveis. Pelo contrário, no grupo de controlos, aproximadamente 68% apresentavam BPA na urina.

A determinação de BPA fez-se sem determinação simultânea de creatinina apesar de muitos estudos publicados apresentarem os resultados de BPA/g de creatinina. Isto prende-se com o facto de ser importante, se os doseamentos forem realizados numa amostra isolada de urina, e se pretende avaliar uma relação com a concentração da mesma, de modo a garantir que não se sobre ou sub-valorizem



resultados, de acordo com as diferentes densidades urinárias apresentadas. Esta forma de doseamento tem vindo a ser ponderada relativamente à excreção de alguns produtos, sobretudo aqueles que não se acumulam no organismo<sup>126</sup>.

No entanto, como as colheitas foram efectuadas em urinas colhidas em 24 horas, esta relação não pareceu vir a ter impacto nos resultados obtidos. Além disso, estudos muito abrangentes e com um número significativo de indivíduos analisados, como o NHANES, referem-se exatamente aos valores de BPA, sem relação com os níveis de creatinina, pelo que se optou por analisar os resultados do mesmo modo. Efetivamente, quando se analisam resultados populacionais, não parece haver vantagem em dosear simultaneamente a creatinina, uma vez que pequenas oscilações na concentração urinária de um indivíduo não se refletem de modo significativo nos doseamentos globais<sup>127</sup>.

As crianças diabéticas têm um seguimento nutricional apertado, e são aconselhadas a manter uma alimentação saudável, com uma diminuição da ingesta de produtos processados. Isso poderia explicar a menor exposição a este composto entre as crianças com DMT1. Alguns trabalhos publicados mostram de modo inequívoco a relação entre o consumo de produtos embalados e o doseamento de BPA<sup>128</sup>.

Por outro lado, o BPA é rapidamente metabolizado e excretado, tendo uma semi-vida curta (inferior a 24 horas), o que significa que o seu doseamento urinário apenas traduz um contacto recente<sup>129</sup>.

Este facto pode explicar o doseamento muito baixo encontrado nas crianças com o diagnóstico de diabetes inaugural: as colheitas foram efetuadas imediatamente após o diagnóstico, o que implica que, na maior parte dos casos, tenham sido feitos os doseamentos ainda durante o internamento das mesmas. Durante a sua permanência no hospital, não foram ingeridos alimentos processados, e é provável que tenha havido uma atenção redobrada nos cuidados alimentares prestados a estas crianças. Pode também ter havido períodos de jejum, o que diminui a probabilidade de se encontrar BPA na urina destas crianças.

Mesmo no grupo controlo, a percentagem de crianças em que foi encontrado BPA é inferior ao relatado noutros países, nomeadamente nos EUA, em que a taxa de deteção é de aproximadamente 90%<sup>130</sup>. Apesar de haver outras fontes de exposição a este composto, a dieta continua a ser a forma mais significativa<sup>131</sup>.

Alimentação de *fast-food* é uma importante fonte de exposição ao BPA, por se tratar de alimentos processados e embalados geralmente em plásticos. Um estudo publicado em 2014, em crianças com idades entre 1 e 5 anos mostrou haver diferenças significativas nos doseamentos quer de BPA quer de ftalatos entre as que consumiam este tipo de alimento e as que não o faziam<sup>132</sup>. Colocamos a hipótese que talvez o consumo de alimentos processados não seja tão elevada no nosso país como noutros, nomeadamente na população americana, em que esses hábitos estão profundamente enraizados. Muito embora este tipo de consumo pareça também ter vindo a aumentar no nosso país, continua distante de outras realidades, bem piores do que a nossa<sup>133</sup>.

Tendo em conta os resultados obtidos, não foi possível estabelecer qualquer relação entre a exposição a este produto e o desenvolvimento de DMT1. Nos últimos anos, a quantidade de artigos que têm vindo a ser publicados sobre disruptores endócrinos é extensa, e permite tentar compreender as razões subjacentes aos achados deste projecto.

Embora esteja descrito que cobaias expostas a BPA desenvolvem fenómenos de insulite, este mecanismo está longe de ser compreendido e explicado, tanto mais que torna óbvio a ausência de uma curva monotónica de resposta, sendo ainda mais complexo por isso mesmo. Assim, Ratos a quem foi ministrada dose baixa de BPA exibiram um perfil diabetogénico, com importante imunomodulação. Em contraste, nos animais a quem foi ministrada dose elevada de BPA, houve até diminuição da quantidade de citocinas produzida. Embora não tenha havido diferenças significativas no processo inicial de insulite, ambos os procedimentos agravaram-no mais tarde<sup>134</sup>.

Este perfil de toxicidade dificulta o estabelecimento de uma associação em seres humanos. O que se destaca, no entanto, é ser reconhecido um efeito de alterador endócrino, com capacidade também de alteração imunológica. Nas células beta pancreáticas, a exposição ao BPA pode desencadear um influxo rápido de cálcio, com libertação de insulina e alteração do metabolismo da glicose<sup>135</sup>.

No sistema imunológico, o BPA tem a capacidade de alterar a sua normal resposta adaptativa, nomeadamente no que respeita às respostas Th1 e Th2, assim como alterar a produção de citocinas<sup>39,136</sup>. O aumento da resposta Th1 resulta numa atividade pró-inflamatória, tendo o desvio Th2 a consequência oposta<sup>137</sup>. Um desequilíbrio nesta relação Th1/Th2 pode contribuir para o aparecimento de doenças auto-imunes<sup>138</sup>.

Nos últimos anos, têm vindo a ser publicados vários artigos que salientam o papel do BPA como indutor de alterações endócrino-metabólicas quando o indivíduo é exposto a este químico durante

determinados períodos da vida. Sobretudo em estudos pré-clínicos, tornou-se óbvio que existem certas janelas temporais em que a exposição ao BPA é particularmente lesiva.<sup>135</sup> A vida *in utero* é um desses períodos, tanto mais, tendo em conta a capacidade do BPA atravessar a placenta, sendo encontrado no líquido amniótico<sup>29,117,118</sup>.

Além da questão da exposição *in utero* ao BPA, existe ainda a condicionante da própria imaturidade enzimática fetal, diminuindo assim a glicurono-conjugação hepática que este composto habitualmente sofre<sup>39</sup>. Assim, é expectável que a semi-vida deste composto no feto seja superior à sua semi-vida no indivíduo adulto, causando, por esta razão, mais alterações. Parece também induzir mecanismos epigenéticos, com interferência no processo de adipogénese, e consequente reprogramação genética<sup>135</sup>.

Os mecanismos mais frequentemente referidos como epigenéticos são a metilação do DNA, a modificação de histonas e a interferência com a produção de RNA<sup>139</sup>. O BPA é capaz de induzir estas modificações<sup>140,141</sup>. Isto pode explicar mecanismos de insulinoresistência tardios, sobretudo em ambientes favorecedores do mesmo<sup>135,142</sup>.

Ora, tem vindo a ser discutido que, contrariamente à visão dicotómica em que a insulinoresistência aparece associada a DMT2 e a autoimunidade com a DMT1, parece haver por vezes uma tendência para o aparecimento de insulinoresistência antes da DMT1<sup>143</sup>. À medida que aumenta a resistência à insulina, a glicemia vai aumentando, com consequente aumento da libertação de insulina<sup>144</sup>. Na DMT2, o que sucede é haver um esgotamento da capacidade de resposta das células beta, com consequente hiperglicemia sustentada e portanto, com o diagnóstico de diabetes<sup>145</sup>.

Por outro lado, há uma associação entre o desencadear da resistência à insulina e a depleção de células beta. Esta, ocorre principalmente através de mecanismos de glicotoxicidade, lipotoxicidade e inflamação, com libertação de interleucina-1-beta e apoptose<sup>146</sup>.

As células beta possuem um número elevado de recetores de IL-1B<sup>147</sup>. Esta citocina é um importante mediador de disfunção celular, potenciada pela presença de outras como a TNF-alfa e INF-gama.<sup>148</sup> A activação destas vias promove a apoptose das células beta<sup>149</sup>. O resultado destes processos é o aparecimento de um *pool* de células beta lesadas, com restos antigénicos abundantes e capazes de desencadear um mecanismo de autoimunidade<sup>144</sup>. O que parece diferenciar a DMT1 da DMT2 é então, sobretudo, a rapidez de instalação desta autoimunidade<sup>144</sup>.

É pois de ponderar que o risco de desencadear diabetes associada a este químico seja estabelecido muito precocemente na vida da criança, quer através de mecanismos associados à imunomodulação, quer através de fenómenos de insulinoresistência, os quais vão também condicionar alteração imunológica.

Apesar de existirem muitos estudos no modelo animal, e independentemente do seu óbvio valor, tendo em consideração o diferente metabolismo e farmacocinética do ser humano, será determinante que haja mais estudos clínicos de modo a conseguir definir melhor os efeitos metabólicos deste produto. É também fundamental ponderar o eventual efeito sinérgico entre este composto e outros poluentes ambientais, aos quais habitualmente ocorre uma exposição simultânea e que poderá explicar alguns fenómenos ainda não compreendidos.

A actual utilização de produtos similares e dele derivados, torna ainda mais premente a persistência na investigação básica e clínica deste químico<sup>150</sup>.

### **Conclusões**

O doseamento de BPA nas crianças com DMT1 e diabetes inaugural é muito inferior ao relatado na literatura. Este facto poderá dever-se à evicção de consumo de produtos processados por estas crianças, por indicação terapêutica, assim como ao facto de as crianças com diabetes inaugural terem feito doseamentos após eventual período de jejum. As crianças do grupo controlo têm doseamentos urinários inferiores ao relatado nos trabalhos americanos, o que pode traduzir diferentes padrões alimentares da sociedade portuguesa.

A impossibilidade de tirar conclusões relativamente à influência do BPA sobre o desencadear da DMT1 pode dever-se a vários fatores, nomeadamente a sua interferência poder ser maior em determinados períodos temporais, como durante a vida fetal, neonatal ou infância; haver um mecanismo de insulinoresistência que preceda o aparecimento de autoimunidade e portanto, tenha um desfasamento temporal relativamente ao aparecimento da doença; haver mecanismos sinérgicos com outros produtos químicos; a sua curva de acção não ser monotónica, o que dificulta extraordinariamente a avaliação do seu impacto em termos de saúde pública.

## 3.1.2. Ftalatos

Environmental Science and Pollution Research  
<https://doi.org/10.1007/s11356-018-1997-z>

### RESEARCH ARTICLE



## Phthalates and type 1 diabetes: is there any link?

Cíntia Castro-Correia<sup>1,2</sup> · Luísa Correia-Sá<sup>3</sup> · Sónia Norberto<sup>4</sup> · Cristina Delerue-Matos<sup>3</sup> · Valentina Domingues<sup>3</sup> · Cristina Costa-Santos<sup>5,6</sup> · Manuel Fontoura<sup>1</sup> · Conceição Calhau<sup>6,7</sup>

Received: 29 November 2017 / Accepted: 9 April 2018  
© The Author(s) 2018

### Abstract

Phthalates are a group of chemical compounds used as plasticizers in the manufacture of plastic materials. They can be present in many commonly used products. There seems to be a relationship between exposure to phthalates and the occurrence of metabolic dysfunctions, such as a decrease in glucose tolerance, oxidative stress, loss of beta cells, and a decrease in insulin synthesis. As beta cells play a key role in the onset of type 1 diabetes mellitus (T1DM), we sought to investigate the relationship between exposure to phthalates and the diagnosis of T1DM in prepubertal children. Design concentrations of phthalate metabolites were compared in the urine of a population of prepubertal children with new-onset diabetes, patients with T1DM diagnosed more than 6 months previously, and healthy control children. Although the concentrations of DBP and DiBP metabolites were statistically identical in the new-onset diabetes, diabetes, and control groups, there was a clear trend for higher levels of DiBP metabolites in the children with new-onset diabetes. In our sample, there was a trend for higher levels of DiBP metabolites in children with new-onset diabetes.

**Keywords** Phthalates · Type 1 diabetes

Responsible editor: Philippe Garrigues

✉ Cíntia Castro-Correia  
[Cintiacastro-correia@hotmail.com](mailto:Cintiacastro-correia@hotmail.com)

<sup>1</sup> Unit of Pediatric Endocrinology, Pediatrics Service, São João Integrated Pediatric Hospital, School of Medicine of the University of Porto, Porto, Portugal

<sup>2</sup> Hospital S João, Serviço de Pediatria, Alameda Hernâni Monteiro, 4200 Porto, Portugal

<sup>3</sup> REQUIMTE/LAQV-GRAQ, Institute of Engineering of Porto of the Polytechnic Institute of Porto, Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto, Portugal

<sup>4</sup> Department of Biochemistry, School of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

<sup>5</sup> MEDCIDS - Department of Community Medicine, Health Information and Decision, School of Medicine, University of Porto, Porto, Portugal

<sup>6</sup> Center for Research in Health Technologies and Information Systems (Centro de Investigação em Tecnologias e Serviços de Saúde – CINTESIS), Porto, Portugal

<sup>7</sup> Nutrition and Metabolism, NOVA Medical School, Universidade Nova de Lisboa, Campo dos Mártires da Pátria, 130, 1169-056 Lisbon, Portugal

### Abbreviations

BMI	Body mass index
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phthalate
DBP	Dibutyl phthalate
DIBP	Diisobutyl phthalate
LOD	Limit of detection
MBP	Monobutyl phthalate
MiBP	Mono-isobutyl phthalate
T1DM	Type 1 diabetes mellitus

### Introduction

Phthalates are a group of chemical compounds used in the manufacture of plastic materials, such as PVC (Wittassek et al. 2007). They are frequently used as plasticizers (Koch and Calafat 2009). Since phthalates are not chemically bound to the plastic structure, these compounds may be released to the air and other media with which they are in contact. Their main route of entry into the body is through ingestion of contaminated food (Dong et al. 2017). Because plastic materials containing phthalates as plasticizers are used on a large scale, phthalates can be present in toys, building materials, food packaging, and various other commonly used products (Fourth Report 2009). In recent years, phthalate production

Published online: 21 April 2018



has increased significantly (Baillie-Hamilton 2002), and their importance in public health is reflected, for example, by the fact that the majority of the European population excrete phthalate metabolites in their urine samples (Schwedler et al. 2017).

Among phthalates, the compound dibutyl phthalate (DBP) stands out as one of the most abundant components of some plastics (Wittassek et al. 2007).

DBP is not chemically bound to PVC and may, over time, contaminate other materials (Moreira et al. 2013).

Phthalates have the capacity to function as endocrine disruptors. They seem to interfere with a multitude of mechanisms, influencing the hormonal status (Sun et al. 2017).

Phthalates are able to disrupt the hypothalamic-pituitary-thyroid axis (HPTA) (Sun et al. 2017). They seem to play a major role in testicular dysgenesis syndrome, a syndromic complex accounting for a number of genito-reproductive disorders (Skakkebaek et al. 2003).

Phthalates may alter glucose metabolism and adipogenesis (Grun and Blumberg 2007; Casals-Casas et al. 2008; Desvergne et al. 2009). Elevated levels of phthalates have been associated with an increased BMI and waist circumference in adults and children (Stahlhut et al. 2007; Hatch et al. 2008).

Perinatal exposure to DEHP in rats results in important alterations in glucose homeostasis, which are gender- and age-dependent (Lin et al. 2011).

The onset of type 2 diabetes mellitus and metabolic syndrome after exposure to phthalates seems to have insulin resistance as its underlying mechanism (Song et al. 2016), and some studies have demonstrated that alterations in oxidative stress, induced by phthalates, are a causative factor (Kim et al. 2013).

Exposure to phthalates leads to a reduction in the pancreatic insulin content, a loss of beta cells, and an abnormal ultrastructural pattern of these cells (Lin et al. 2011). Human and rat studies have shown that the presence of DEHP is associated with DNA damage (Caldwell 2012). This change may induce an alteration in insulin synthesis. Many studies have been conducted on DEHP, but much less investigation has been carried out on other phthalates, such as DBP and DiBP.

Given that beta cells play a key role in the onset of type 1 diabetes mellitus (T1DM) and that many of the changes described above cause a decrease in the number of these cells, a relationship between the exposure to DBP and DiBP and the diagnosis of T1DM was investigated in a prepubertal children group in this study.

## Materials and methods

### Participants

From a total of 302 T1DM patients followed up at the pediatric endocrinology clinic, 20 patients (12 males and 8 females)

were randomly selected based on the assumption that they were prepubertal. These patients were aged 6 to 10 years, had a body mass index (BMI) below the 85th percentile, and were diagnosed with T1DM more than 6 months previously; they had no microvascular complications and no other diseases, and they did not use any associated medications. In the same period of time (2012–2014), all children with an initial diagnosis of diabetes (< 6 months after diagnosis) who visited the Endocrinology Clinic of the São João Hospital ( $n = 8$ ) were included. São João is a university general hospital focused on providing the best health care, with high levels of competence and excellence, and encouraging training and research.

The control group included healthy children followed up at the pediatric surgery unit ( $n = 10$ ) and hospitalized for minor planned surgical procedures.

All the diabetic children were treated with glargine and rapid-acting analogues (lispro, aspart, or glulisine) through multiple daily injections, according to the ISPAD (International Society of Pediatric and Adolescent Diabetes) guidelines (Danne et al. 2014).

All urine samples were collected in glass containers so that the contamination factor was reduced.

The project was approved by the Institutional Ethics Committee, and all patients' parents/guardians signed an informed consent form prior to the commencement of the study.

### Chemical analysis

Urine samples were collected on the same day and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis. The samples were analyzed for phthalates and metabolites via solid-phase extraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPE-GC/MS) after enzymatic hydrolysis with beta-glucuronidase overnight at  $37^{\circ}\text{C}$  (from *E. coli*, without arylsulfatase activity); the internal standard DEHP-3,4,5,6-d4 was also added. Elution was performed with ethyl acetate, and then the samples were dried under a gentle stream of  $\text{N}_2$  and redissolved in 100  $\mu\text{L}$  of the derivatization reagent (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) + 1% trimethylchlorosilane (TMCS)). This mixture was placed in a water bath at  $80^{\circ}\text{C}$  for 30 min. The final extract was transferred to a glass insert (in a GC vial) and analyzed using the GC-MS system. Chromatographic analyses were carried out in a TRACE GC Ultra gas chromatograph with Polaris Q coupled to an ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) operated in electron impact ionization (EI) mode at 70 eV and controlled by Xcalibur 1.3. The helium carrier gas (Linde Sógas, purity  $\geq 99.999\%$ ) was maintained at a constant flow of 1 mL/min. Injections (2  $\mu\text{L}$ ) were carried out in splitless mode. A Phenomenex ZB-XLB column (30 m  $\times$  0.25 mm I.D., 0.25- $\mu\text{m}$  film thickness) was used. The GC oven temperature was programmed from an initial

temperature of 90 °C (1 min hold), ramped up at 15 °C/min to 250 °C (1 min hold), increased to 255 °C at 20 °C/min (5 min hold), and finally increased to 270 °C at 10 °C/min (1 min hold). This program resulted in a total run time of 23.42 min. The other optimized parameters included a transfer line temperature of 270 °C and an ion source temperature of 250 °C. The compounds were quantified with selected ion monitoring (SIM). Identification was confirmed by the retention times and ion ratios.

The method detection limits (MDLs) in the urine were 0.0011 and 0.00018 mcg/L for mono-isobutyl phthalate (MiBP) and monobutyl phthalate (MBP), respectively.

### Statistical methods

Some of the evaluated children presented with values lower than the limit of detection (LOD). Therefore, the groups (diabetes, new diabetes and control) were compared using Fisher's exact test in terms of the percentage of children who had measurable levels of phthalate metabolites in their urine.

The Kruskal-Wallis test was then used to compare phthalate levels among the groups in only those cases in which these levels were measurable.

A significance level of 0.05 was used for all tests.

### Results

The children were divided into three groups as follows: without diabetes (controls); with T1DM for more than 6 months (diabetes); and new-onset diabetes (new diabetes).

The characteristics of the patients are described in Table 1.

Some of the children evaluated had phthalate concentrations lower than the LOD, and others had phthalate concentrations lower than the LOQ. Neither of these groups were taken into account. No statistically significant differences were found among the groups in the percentage of cases with measurable levels of phthalates (Table 2).

MiBP is a urinary metabolite of the parental chemical diisobutyl phthalate (DiBP), and MBP is a di-n-butyl phthalate (DBP) metabolite.

**Table 1** Characteristics of the evaluated patients by groups

	Controls ( <i>n</i> = 10) median (min–max)	Diabetes ( <i>n</i> = 20) median (min–max)	New diabetes ( <i>n</i> = 8) median (min–max)
Age at diagnosis (years)	–	3.2 (0.9–9.1)	8.9 (2.3–9.7)
Current age (years)	5.3 (3.1–8.6)	7.3 (3.5–11.3)	9.0 (2.2–9.7)
Illness duration (years)	–	2.6 (0.3–7.2)	–
BMI	17.0 (15.4–20.8)	17.0 (15.8–22.1)	16 (14.5–19.2)
HbA1c (%)	–	8.3 (6.6–10.2)	9.4 (8.2–10.6)

**Table 2** Statistics of the cases who had measurable levels of phthalates

	Controls ( <i>n</i> = 10) <i>n</i> (%)	Diabetes ( <i>n</i> = 20) <i>n</i> (%)	New diabetes ( <i>n</i> = 8) <i>n</i> (%)	<i>p</i>
MIBP	9 (90)	15 (75)	7 (88)	0.640
MBP	2 (20)	3 (15)	3 (38)	0.435

Considering only the children who had detectable phthalate concentrations in the urine, there were no statistically significant differences in the DBP and DiBP urine metabolites among the groups (Table 3). Nevertheless, there was a clear trend towards higher median values in the children with inaural diabetes.

### Discussion

For many reasons, children are more susceptible to the harmful effects of endocrine disruptors. A child's metabolic response to the presence of these substances is different from that of adults (Ginsberg et al. 2004; Faustman et al. 2000). Children have higher metabolic needs, with a greater need for food and water intake per body weight (Moya et al. 2004). Children are also often more exposed to phthalate-containing materials because of physiological and behavioral factors. They may have behaviors that pose a greater risk of contact with contaminants, such as placing objects in their mouths and crawling (Moya et al. 2004), especially younger children.

Diisobutyl phthalate (DIBP) is a colorless, transparent, oily liquid used as an alternative to DBP (dibutyl phthalate). It is used in nitrocellulose and alkyd resin paints. Both DIBP and DBP are plasticizers. Phthalates are not tightly bound to the plastic; therefore, they are easily released into the environment, accumulating in the dust in a house (Ginsberg et al. 2016). Both plasticizers are found to be major contributors to phthalate exposure through ingestion (Weldingh et al. 2017).

Exposure to these substances has been decreasing in the past few years, likely due to the legislation regarding their

**Table 3** Median (minimum–maximum) values for the patients who had measurable phthalate levels

	Controls mcg/l	Diabetes mcg/l	New Diabetes mcg/l	<i>p</i>
MIBP	8.4 (1.4–24.9)	11.8 (0.2–229.8)	40.3 (6.7–101.2)	0.117
MBP	29.1 (1.1–57)	13.8 (5.2–151)	39.3 (29.9–851.9)	0.566

use. However, despite the existence of European or American laws, there are other countries that do not follow the same rules and still use plastics with a higher percentage of phthalates, including in toys.

In Portugal, the presence of some phthalates in tap water, as well as in several samples of bottled water (mostly in plastic bottles), was investigated (Santana et al. 2014). Three phthalates (dibutyl (DnBP), diisobutyl (DIBP) and DEHP) were found (Santana et al. 2014). The concentration of DEHP was approximately five times higher in the water in plastic bottles than in the water in glass bottles (Santana et al. 2014). In tap water, only DIBP and DEHP were found (Santana et al. 2014). All samples had phthalate concentrations below 6 µg/l, which is the maximum allowed concentration in water established by the US Environmental Protection Agency (Santana et al. 2014).

Samples from children in our study contained MiBP, a DiBP metabolite, with a much smaller percentage of samples containing DBP metabolites.

Phthalates are substances that function as endocrine disruptors. They may show insulin resistance-inducing effects and aggravate metabolic syndrome (Grun and Blumberg 2007). There is also evidence of some direct effects on beta cells, with a consequent decrease in their insulin secretory potential (Tordjman et al. 2002).

In the past few decades, the incidence of diabetes has increased markedly worldwide (Weldingh et al. 2017). This increase coincides with a marked increase in exposure to a number of synthetic chemicals, including several substances known to have the capacity for endocrine disruption (WHO 2013).

These facts led to the concept of a possible relationship between the exposure to endocrine disruptors and the increase in diabetes mellitus (Neel and Sargis 2011).

T1DM is an autoimmune disease characterized by an extensive loss of pancreatic beta cells and consequent insulin deficiency and hyperglycaemia (Mathis et al. 2001). The underlying mechanism is a process of cell death, which is induced by cytokines (Piot et al. 2008).

Although several studies have sought to establish a relationship between phthalate exposure and the onset of type 2 diabetes, the relationship between these substances and T1DM has been investigated less frequently (Weldingh et al. 2017).

Lin et al. have shown that in rats, exposure to DEHP during pregnancy led to changes in glucose metabolism in the

offspring (Lin et al. 2011). Additionally, direct exposure of pancreatic cells to DEHP caused apoptosis and altered insulin secretion (Sun et al. 2015).

The development of pancreatic autoimmunity precedes the destruction of beta cells and the diagnosis of T1DM (Eisenbarth 1986). Studies have shown a possible relationship between the presence of DBP and the development of immunity (Lourenço et al. 2015). Phthalates, namely, DBP, seem to be able to induce thyroiditis, also an autoimmune disease (Wu et al. 2017).

We evaluated the possibility of the same phenomenon with regard to beta cells, with possible autoimmune mechanisms triggered by the exposure to these endocrine disruptors.

Although the median values in the diabetes and new diabetes groups of children were higher than those in the controls, there were no statistically significant differences among the three groups. However, there was a clear trend for the children with new-onset diabetes to have higher urinary concentrations of phthalate metabolites. Certainly, one of the limitations of our investigation is a small sample size, which may have contributed to the lack of statistical significance.

One factor to be taken into account is that all overweight and obese children were excluded because obesity and overweight could be a confounding factor in this analysis.

## Conclusion

No statistically significant differences were found in the concentrations of urinary metabolites of DiBP and DBP among newly diagnosed diabetic children, children with established type 1 diabetes and healthy controls. However, children recently diagnosed with diabetes showed a tendency to have higher DiBP metabolite concentrations. Considering recent data on these pollutants, it is imperative to conduct clinical studies with larger population samples.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

## References

- Baillie-Hamilton PF (2002) Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic. *J Altern Complement Med* 8(2):185–192



- Caldwell JC (2012) DEHP: genotoxicity and potential carcinogenic mechanisms—a review. *Mutat Res* 751:82–157
- Casals-Casas C, Feige JN, Desvergne B (2008) Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism. *Int J Obes* 32(suppl 6):S53–S61
- Danne T, Bangstad H-J, Deeb L, Jarosz-Chobot P, Mungaie L, Saboo B, Urakami T, Battelino T, Hanas R (2014) Insulin treatment. *Pediatr Diabetes* 15(Suppl. 20):115–134
- Desvergne B, Feige JN, Casals-Casas C (2009) PPAR-mediated activity of phthalates: a link to the obesity epidemic? *Mol Cell Endocrinol* 304(1–2):43–48
- Dong RH, Zhang H, Zhang MR, Chen JS, Wu M, Li SG, Chen B (2017) Association between phthalate exposure and the use of plastic containers in Shanghai. *Biomed Environ Sci* 30(10):727–736
- Eisenbarth GS (1986) Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N Engl J Med* 314:1360–1368
- Faustman EM, Silbernagel SM, Fenske RA, Burbacher TM, Ponce RA (2000) Mechanisms underlying Children's susceptibility to environmental toxicants. *Environ Health Perspect* 108:13–21
- Fourth Report (2009) Fourth Report on human exposure to environmental chemicals. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and human services, Centers for disease control and prevention. <https://www.cdc.gov/exposurereport/>
- Ginsberg G, Hattis D, Sonawane B (2004) Incorporating pharmacokinetic differences between children and adults in assessing children's risks to environmental toxicants. *Toxicol Appl Pharmacol* 198:164–183
- Ginsberg G, Ginsberg J, Foos B (2016) Approaches to Children's exposure assessment: case study with diethylhexylphthalate (DEHP). *Int J Environ Res Public Health* 13(7):670
- Grun F, Blumberg B (2007) Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev Endocr Metab Disord* 8(2):161–171
- Hatch EE, Nelson JW, Qureshi MM, Weinberg J, Moore LL, Singer M, Webster TF (2008) Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999–2002. *Environ Health* 7:27. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-7-27>
- Kim JH, Park HY, Bae S, Lim YH, Hong YC (2013) Diethyl hexyl phthalates is associated with insulin resistance via oxidative stress in the elderly: a panel study. *PLoS One* 8:e71392
- Koch HM, Calafat AM (2009) Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364(1526):2063–2078
- Lin Y, Wei J, Li Y, Chen J, Zhou Z, Song L, Wei Z, Lv Z, Chen X, Xia W, Xu S (2011) Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301: E527–E538
- Lourenço AC, Galbiati V, Corti D, Papale A, Martino-Andrade AJ, Corsini E (2015) The plasticizer dibutyl phthalate (DBP) potentiates chemical allergen-induced THP-1 activation. *Toxicol in Vitro* 29(8):2001–2008
- Mathis D, Vence L, Benoist C (2001)  $\beta$ -cell death during progression to diabetes. *Nature* 414(6865):792–798
- Moreira MA, André LC, Cardael ZL (2013) Analysis of phthalate migration to food simulants in plastic containers during microwave operations. *Int J Environ Res Public Health* 11(1):507–526
- Moya J, Bearer CF, Etzel RA (2004) Children's behavior and physiology and how it affects exposure to environmental contaminants. *Pediatrics* 113:996–1006
- Neel BA, Sargis RM (2011) The paradox of progress: environmental disruption of metabolism and the diabetes epidemic. *Diabetes* 60(7):1838–1848
- Pirot P, Cardozo AK, Eizirik DL (2008) Mediators and mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 52(2):156–165
- Santana J, Giraudo C, Marengo E, Robotti E, Pires S, Nunes I, Gaspar EM (2014) Preliminary toxicological assessment of phthalate esters from drinking water consumed in Portugal. *Environ Sci Pollut Res Int* 21(2):1380–1390
- Schwedler G, Seiwert M, Fiddicke U, Ißleb S, Hölzer J, Nendza J, Wilhelm M, Wittsiepe J, Koch HM, Schindler BK, Göen T, Hildebrand J, Joas R, Joas A, Casteleyn L, Angerer J, Castano A, Esteban M, Schoeters G, Den Hond E, Sepai O, Exley K, Bloemen L, Knudsen LE, Kolossa-Gehring M (2017) Human biomonitoring pilot study DEMOCOPHES in Germany: Contribution to a harmonized European approach. *Int J Hyg Environ Health* 220(4):686–696
- Skakkebaek NE, Holm M, Hoei-Hansen C, Jørgensen N, Rajpert-De ME (2003) Association between testicular dysgenesis syndrome (TDS) and testicular neoplasia: evidence from 20 adult patients with signs of maldevelopment of the testis. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand* 111:1–9
- Song Y, Chou EL, Baecker A, You NC, Song Y, Sun Q, Liu S (2016) Endocrine-disrupting chemicals, risk of type 2 diabetes, and diabetes-related metabolic traits: a systematic review and meta-analysis. *J Diabetes* Jul 8(4):516–532
- Stahlhut RW, van Wijngaarden E, Dye TD, Cook S, Swan SH (2007) Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect* 115(6):876–882
- Sun Y, Lin Q, Huang Q, Shi J, Qiu L, Kang M et al (2015) Di(2-ethylhexyl) phthalate-induced apoptosis in rat INS-1 cells is dependent on activation of endoplasmic reticulum stress and suppression of antioxidant protection. *J Cell Mol Med* 19(3):581–594
- Sun D, Zhou L, Wang S, Liu T, Zhu J, Jia Y, Xu J, Chen H, Wang Q, Xu F, Zhang Y, Ye L (2017) Effect of Di-(2-ethylhexyl) phthalate on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in adolescent rat. *Endocr J* 65: 261–268. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0272>
- Tordjman K, Standley KN, Bernal-Mizrachi C, Leone TC, Coleman T, Kelly DP, Semenkovich CF (2002) PPARalpha suppresses insulin secretion and induces UCP2 in insulinoma cells. *J Lipid Res* 43(6): 936–943
- Welding NM, Jorgensen-Kaur L, Becher R, Holme JA, Bodin J, Nygaard UC, Bolling AK (2017) Bisphenol A is more potent than phthalate metabolites in reducing pancreatic beta-cell function. *BioMed Res Int*:4614379. <https://doi.org/10.1155/2017/4614379>
- Wittassek M, Heger W, Koch HM, Becker K, Angerer J, Kolossa-Gehring M (2007) Daily intake of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by German children—a comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels. *Int J Hyg Environ Health* 210:35–42
- World Health Organization (2013) Fact sheet diabetes: global report on diabetes. <http://www.who.int/diabetes/global-report/en/>. Global Industry Analysts, “Bisphenol A—A Global Strategic Business Report”
- Wu Y, Li J, Yan B, Zhu Y, Liu X, Chen M, Li D, Lee CC, Yang X, Ma P (2017) Oral exposure to dibutyl phthalate exacerbates chronic lymphocytic thyroiditis through oxidative stress in female Wistar rats. *Sci Rep* 7:15469. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15533-z>

### 3.1.3. Pesticidas Organoclorados

A utilização de pesticidas na agricultura intensiva provoca uma contaminação ambiental importante, quer da terra como do ar e da água. Muitos destes produtos têm algumas características comuns, como a lipofilia, bioacumulação e semi-vida longa, o que aumenta a probabilidade de se manterem durante longos períodos no meio ambiente<sup>63</sup>. Há vários tipos de pesticidas, de acordo com as suas características químicas. Um dos grupos mais utilizados foi o dos organoclorados, nomeadamente por se tratarem de compostos de fácil utilização e de baixo custo<sup>63</sup>.

**Tabela 3:** Pesticidas organoclorados - tipos de utilização e semi-vida.

	Utilização	Semi-vida
DDT	Acaricida/inseticida	2-15 anos
DDD	Inseticida	5-10 anos
DDE	Inseticida	10 anos
Dicofol	Acaricida	60 dias
Endrina	Inseticida	12 anos
Dieldrina	Inseticida	9 meses
Metoxicloro	Inseticida	10 anos
Heptacloro	Inseticida	2 anos
Lindano	Acaricida/inseticida/raticida	15 meses
Endosulfano	Inseticida	35-150 dias
Isodrina	Inseticida	0,5-6 anos
Isobenzano	Inseticida	2,8 anos
Cloropropilato	Inseticida/acaricida	50 dias
Aldrina	Inseticida	4-7 anos
Hexacloroeto benzeno (BHC)	Acaricida/inseticida/raticida	3-6 anos
Mirex	Inseticida	10 anos
Pentaclorofenol	Fungicida/Herbicida/Inseticida	45 dias
Toxafeno	Acaricida/Inseticida	11 anos

Os pesticidas organoclorados são um grupo de químicos industriais que apresentam um anel fenólico e diversos graus de cloração<sup>151</sup>. A sua produção teve início em 1920, e grande parte foi banida nos anos 70<sup>151</sup>. Foram também utilizados no fabrico de borrachas, resinas, adesivos, tintas, e graças a essa utilização maciça, tiveram uma enorme dispersão no ambiente<sup>152</sup>.

Estes POP's apresentam uma marcada lipofilia, acumulando-se no tecido adiposo, tendo assim potencial para manterem durante longos períodos de tempo o seu efeito de interferência endócrina<sup>151</sup>. O DDT, por exemplo, é um inseticida sintético de semi-vida extremamente longa, que foi largamente utilizado até ser banido na maior parte dos países desenvolvidos<sup>151</sup>.

A lipofilia que caracteriza os pesticidas organoclorados, com acumulação no tecido adiposo faz com que eles se vão libertando lentamente para a corrente sanguínea, especialmente em períodos de emagrecimento<sup>151</sup>. Este facto dificulta marcadamente a avaliação do seu impacto na saúde, uma vez que os doseamentos ideais são efetivamente no tecido em que eles se acumulam, isto é, na gordura<sup>151</sup>.

Os pesticidas organoclorados têm vindo a ser associados a várias patologias relacionadas com a sua atividade disruptora endócrina<sup>151</sup>. Nos últimos anos, tem surgido bastante evidência científica que liga a presença de alguns POPs, nomeadamente estes pesticidas, com o aumento da incidência de DMT2<sup>151</sup>.

Embora o aumento da incidência de DMT2 seja habitualmente assumido como causado pela ingestão de alimentos excessivamente calóricos, associados à falta de exercício físico, condicionando obesidade e consequentemente, insulinoresistência, aquilo que se verifica é que indivíduos com o mesmo grau de obesidade apresentam diferentes graus de risco de desenvolvimento desta doença<sup>153</sup>. Um facto interessante é que embora 80% dos doentes com DMT2 sejam obesos, aproximadamente 75-80% dos indivíduos obesos não desenvolvem DMT2<sup>154</sup>.

Têm sido investigadas eventuais associações genéticas com o risco de desenvolver esta doença, mas estas só foram encontradas em cerca de 10% dos casos<sup>155</sup>. Portanto, a obesidade por si só não parece explicar o aumento marcado da incidência desta patologia.<sup>156</sup>

Em Janeiro de 2011, o Programa Nacional de Toxicologia dos EUA e o Instituto Nacional de Ciências da Saúde Ambiental realizaram um *workshop* que teve como objetivo avaliar os dados científicos disponíveis no momento relativamente à associação entre a exposição humana a várias substân-

cias químicas e o desenvolvimento de determinadas patologias<sup>157</sup>. Uma das principais conclusões foi a de que havia evidência suficiente para considerar que os POP são efetivamente um factor de risco para o aparecimento de DMT2 em humanos<sup>158</sup>.

Um dos maiores estudos a pesquisar a relação entre a exposição a alguns POP e a DMT2 foi o NHANES, que avaliou a população americana entre 1999 e 2000<sup>159</sup>. Este estudo procurou ser uma adequada representação da população americana civil. Neste projeto em particular foram avaliados seis POP (dois *PCDD Polychlorinated dibenzodioxins* – dioxinas dibenzopolicloronadas; um PCB - bifenilo policloronado, e três metabolitos de pesticidas organoclorados)<sup>159</sup>. Estes seis compostos foram associados positivamente com a prevalência de DMT2, mesmo após ajuste para outros factores de risco conhecidos, como obesidade<sup>159</sup>.

Outro achado interessante deste estudo foi a interação entre a exposição aos POP e obesidade no risco de DMT2<sup>159</sup>. A associação entre POP e DMT2 era maior nas pessoas obesas, e havia também uma associação positiva entre a presença de POP e DMT2 em indivíduos com um IMC normal (< 25 kg/m<sup>2</sup>)<sup>159</sup>. No entanto, nas pessoas com menor quantidade de POP, a obesidade não se associava a DMT2, mesmo que apresentassem um IMC > 30 kg/m<sup>2</sup><sup>160</sup>. Outros estudos realizados na Finlândia e em Espanha reforçam a associação positiva entre a presença de POP e DMT2, simultaneamente com o aumento do IMC<sup>161,162</sup>.

Uma das questões que se tem colocado ao discutir a relação entre a exposição a estes químicos e o desenvolvimento de insulinoresistência prende-se com a hipótese de poder ser um achado que reflita a realidade inversa, isto é, que as pessoas com DMT2 eventualmente tenham um metabolismo alterado destes químicos e que isso se traduza em níveis superiores encontrados nestes indivíduos. Nesse caso, o facto de ter DMT2 condicionaria um aumento do nível sérico de POP e não o contrário<sup>171</sup>. Esta hipótese não foi corroborada por dois estudos publicados e nos quais, não foi encontrada diferença na taxa de eliminação de POP em relação com a presença ou duração de DMT2<sup>164,165</sup>.

Outra hipótese colocada para explicar esta associação foi a de que, uma vez que há uma associação conhecida entre obesidade e DMT2, as concentrações de POP nos obesos fossem mais elevadas, tendo em conta a sua lipofilia<sup>166</sup>. Esta hipótese persiste como possível.

Ruzzin e colaboradores realizaram um estudo de experimentação animal cujos resultados foram marcantes nesta área<sup>167</sup>. Ratos adultos foram divididos em dois grupos: um alimentado com óleo

de peixe contaminado com uma mistura de POP em níveis frequentemente encontrados no ambiente e outro, alimentado com o mesmo tipo de óleo de salmão, mas refinado para ter apenas concentrações muito baixas destes químicos. Os alimentos contaminados por POP são a principal fonte de contaminação humana, pelo que esta abordagem mimetiza o padrão de exposição humano em termos de misturas e doses de POP<sup>167</sup>. As cargas corporais de POP nestes animais foram idênticas às encontradas em indivíduos no Norte da Europa na 5ª e 6ª décadas de vida<sup>168</sup>. Os ratos foram assim alimentados por um período de 4 semanas. Durante este tempo, os ratos expostos às concentrações mais elevadas de POP apresentaram insulinoresistência, obesidade visceral, dislipidemia, esteatose hepática e marcadores de inflamação crónica, contrariamente ao grupo controlo<sup>167</sup>.

Estes autores efectuaram também estudos *in vitro*, e incubaram adipócitos com uma mistura de POP, nomeadamente pesticidas organoclorados, entre outros e observaram que a presença destes compostos e de PCB desencadeavam insulinoresistência nestas células<sup>167</sup>. Esta resistência foi constatada com a exposição a doses baixas, e não presenciada quando as células foram expostas a concentrações 10 a 100 vezes superiores, levando mais uma vez a colocar a hipótese destes compostos terem curvas de ação não monotónicas<sup>167</sup>.

Os mesmos investigadores publicaram outro estudo em que avaliaram o resultado da exposição de ratos ao consumo de salmão contaminado com POP *versus* um grupo alimentado com carne de baleia, portanto, um mamífero, no qual as concentrações de POP são ainda mais elevadas<sup>169,170</sup>. Os ratos alimentados com salmão desenvolveram obesidade visceral e intolerância à glicose, tendo melhorado quando o peixe que passaram a ingerir foi descontaminado de POP<sup>169</sup>. Por outro lado, os animais alimentados com carne de baleia (e portanto, com níveis bastante mais altos de POP) diminuíram de peso e melhoraram a sensibilidade à insulina<sup>170</sup>. Os autores intepretaram estes achados referindo que os POP em doses baixas parecem ser mais lesivos no que diz respeito à insulinoresistência e DMT2 do que níveis mais elevados destas substâncias, propondo uma curva de ação em U invertido.

Os mecanismos pelos quais os pesticidas organoclorados influenciam o desenvolvimento de síndrome metabólico não são bem compreendidos. Parece ocorrer alguma disfunção do tecido adiposo e um estado inflamatório de baixo grau<sup>171,172</sup>. O aumento de mediadores pró-inflamatórios como Interleucina-6, factor de necrose tumoral-alfa e adipocinas parecem conduzir a este fenómeno de inflamação crónica<sup>171</sup>.

Os organoclorados induzem também modificações no *uptake* de ácidos gordos, o que provoca uma série de alterações e anomalias metabólicas associadas à intolerância à glicose<sup>173</sup>. Embora este projeto vise a DMT1, havendo atualmente a noção de que existe frequentemente uma certa insulinoresistência que precede o desencadear de autoimunidade, é possível que o agravamento da intolerância à glicose possa aumentar o risco de DMT1<sup>144</sup>.

Por outro lado, e sabendo que estes produtos desencadeiam resistência à insulina, foi colocada a hipótese que a sua presença condicionasse algum agravamento do controlo metabólico, e que diabéticos com maior concentração destes químicos apresentassem uma HbA1c mais elevada.

Apesar da legislação que tem vindo a proibir a utilização de pesticidas organoclorados e DDT em grande parte dos países, a exposição a estes compostos mantém-se, em grande parte devido ao consumo de gorduras de origem animal<sup>174</sup>. A sua resistência à degradação metabólica faz com que eles se acumulem ao longo da cadeia alimentar<sup>175</sup>. No entanto, o seu doseamento na população tem sido mais baixo, devido à sua utilização ter vindo a ser banida<sup>176</sup>.

## Material e métodos

### População

De um total de 302 doentes seguidos na Unidade de Endocrinologia Pediátrica, foram selecionados aleatoriamente 30 doentes (15 masculinos e 15 femininos), todos com idades compreendidas entre os 6 e os 12 anos e pré-púberes. Todos apresentavam IMC < 85, tendo sido diagnosticados há mais de 6 meses. Nenhum apresentava complicações microvasculares e não utilizava qualquer outra medicação para além da insulinoterapia. Todos utilizavam esquema funcional de insulina, com insulina glargina e análogos rápidos (lispro, asparto ou glulisina). No mesmo período de tempo, foram incluídas crianças da mesma idade e com o diagnóstico de diabetes há menos de 6 meses, as quais constituíram o grupo de Diabetes inaugural (n=6). O grupo controlo (n=14) incluiu crianças saudáveis seguidas na consulta de Cirurgia Pediátrica e internadas para procedimentos cirúrgicos menor (correção de orelhas de abano, fimose, polegar em mola, por exemplo).

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de S João e todos os pais/responsáveis parentais assinaram um consentimento informado antes do início do estudo.

Tabela 4: Caracterização da amostra.

	Feminino/ Masculino	Idade (Anos) (min-max; media)	HbA1c (%) (min-max; media)
<b>DMT1 (n=30)</b>	15/15	3,3 - 11,6; 7,7	6,3 - 12,5; 8,4
<b>Diabetes inaugural (n=6)</b>	3/3	4,1 - 10,3; 8,2	8,2 - 10,7; 9,7
<b>Controlos (n=14)</b>	5/9	2,4 - 8,9; 5,7	-

Também aqui se selecionaram crianças com IMC < 85 com o objetivo de diminuir a interferência do tecido adiposo, tendo em consideração a marcada lipofilia destes compostos<sup>156</sup>.

Foram determinados os níveis séricos vários pesticidas organoclorados, nomeadamente: Lindano (Isómero gama de 1,2,3,4,5,6-hexaclorociclohexano) e alguns dos seus metabolitos: Alfa - HCH ( $\alpha$ -Hexaclorociclohexano é um isómero do Lindano), Beta - HCH (B-Hexaclorociclohexano é outro isómero)<sup>177</sup>, DDT (diclorodifeniltricloroetano), DDD (diclorodifenildicloroetano); e DDE (Diclorodifenildicloroetileno). DDD e DDE são metabolitos do DDT. Relativamente ao Hexaclorociclohexano, o Isómero gama é o único com propriedades inseticidas.

### Soluções

Neste trabalho foram utilizadas soluções de pesticidas organoclorados (OCPs) ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\zeta$  - hexaclorociclohexanos (HCH); o,p'-DDT ([1,1,1 tricloro-2,2-bis-(p-clorofenilo) etano]); p,p'-DDE ([2,2-bis(p-clorofenilo)-1,1-dicloroetileno]); p,p'-DDD (diclorodifenildicloro-etano); aldrina; dieldrina; endrina;  $\alpha$ -,  $\beta$ - endossulfano e metoxicloro). Os padrões dos pesticidas (pureza >97,0 %) foram obtidos de Chemservice (West Chester, PA, USA), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) e Sigma-Aldrich Co. O padrão interno, 4.4'- dichlorobenzofenona foi comprado na Sigma-Aldrich Co. O n-hexano e o acetonitrilo usado eram de HPLCgrade e foram adquiridos na Merck (Germany). O diclorometano e o ácido fórmico usado foram comprados na Sigma-Aldrich Co e o metanol na Merck (Germany). As soluções padrão dos OCPs foram preparados em n-hexano com diferentes concentrações (soluções mãe). As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções mãe. As soluções de trabalho foram guardadas a 4°C.

### Preparação das amostras

O sangue foi centrifugado a 2000 g durante 15 min a temperatura ambiente. O plasma foi separado e guardado a -80°C até ser analisado.

#### Extração a partir do plasma

A cada amostra foi adicionado 20 µg/L (concentração final) de padrão interno este foi adicionado a um tubo de vidro e evaporado até secar num *speed-vacuum* a aproximadamente 20 °C. As amostras de plasma foram adicionadas aos tubos de vidro, foram misturadas usando vortex e submetidas a banho ultrassónico por 30 min. Foi adicionada 1 mL da mistura (1:1) ácido fórmico e água ultrapura da Milipore e as amostras, foram novamente submetidas a banho ultrassónico durante 30 min para desnaturação das proteínas.

Em seguida foi efetuada extração em fase sólida utilizando cartuchos Strata C18-E (55 µm, 70 Å) em sistema de vácuo. Para condicionamento dos cartuchos foi utilizado 4 mL de diclorometano 1 mL de metanol e 2 mL de água ultrapura da Milipore. Antes da secagem dos cartuchos foi efetuada a passagem da amostra, de seguida os cartuchos foram lavados com 4 mL de água ultrapura da Milipore e foram deixados a secar durante 1 hora em vácuo. Para proceder à eluição dos analitos presentes no plasma foram utilizados 2 mL de n-hexano, deixado a secar por mais 5 min em vácuo e 2 mL de diclorometano/n-hexano (1:1).

O eluato foi levado à secara através de uma corrente de azoto e redissolvidos em 250 µL de n-hexano para análise em Cromatografia Gasosa com Detetor de Captura de Eletrões (GC-ECD).

#### Cromatografia Gasosa com Detetor de Captura de Eletrões

Os OCPs foram analisados utilizando um equipamento de cromatografia gasosa Shimadzu GC-2010 com detetor ECD, equipado com coluna capilar de 30 m, ZB-XLB (0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Zebron-Phenomenex). A temperatura programada de início foi 40 °C (durante 1 min), de seguida uma rampa de 30 °C/min até aos 220 °C (durante 5 min), depois 10 °C/min até aos 290 °C (durante 2 min). O injetor foi mantido a 250 °C em modo splitless, e a deteção foi realizada aos 300 °C. Hélio (Linde Sogás) foi utilizado como gás de arraste a um caudal constante de 1,3 mL/min, enquanto azoto (Linde Sogás, purity ≥99.999%) foi utilizado como gás auxiliar a um ritmo constante de 30 mL/min. A aquisição de dados foi feita utilizando *software* GC-Solutions Shimadzu.

#### Validação do método

O método foi validado de acordo com as diretivas da União Europeia (EC SANCO/10684/2009) (Comissão Europeia 2009). Linearidade, sensibilidade, (repetibilidade, em termos de percentagem relativa de desvio padrão). O limite de deteção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram determinados considerando o declive e o desvio residual da curva de calibração, calculado utilizando equação de Miller<sup>182</sup>.



#### Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC-MS/MS)

As amostras com resultados positivos utilizando GC-ECD, foram também analisadas utilizando um *Thermo Trace-Ultra* cromatografo acoplado a um Espectrómetro de Massa *Thermo Polaris*, com ionização a 70 eV. Temperatura de *ion source* e de *MS transfer* foi de 250 °C. A aquisição de dados foi efectuada utilizando *software* Xcalibur v 1.3. A confirmação dos analitos foi efectuada utilizando GC-MS/MS com uma coluna SLB-5ms (0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness, Supelco) com 30 m. O injector foi utilizado em modo *splitless*; hélio (Linde Sogás) foi utilizado como gás de arraste a um fluxo constante de 1,3 mL/min. O injector foi mantido a 240°C. A temperatura do forno foi programada para começar nos 40°C (1 min), de seguida uma rampa de 30°C/min até aos 220°C (durante 5 min), depois 10°C/min até aos 290°C (durante 1 min). A identificação dos pesticidas foi realizada utilizando os tempos de retenção obtida no GC-ECD, GC-MS e a massa de três iões para cada analito.

## Resultados

O único pesticida encontrado foi Lindano.

**Tabela 5:** Percentagem de crianças com Lindano doseável na plasma.

Grupo	Lindano doseável
<b>Diabetes</b>	11 (37%)
<b>Diabetes inaugural</b>	1 (17%)
<b>Controlo</b>	4 (29%)

Não foram encontradas diferenças significativas na percentagem de lindano doseável entre os três grupos (diabetes, diabetes inaugural, controlo).  $p=0,748$  *Fisher Exact Test*.

Em quatro crianças foi encontrado Lindano em níveis > LOD (*Limit Of Detection*) mas inferiores ao LOQ (*Limit Of Quantification*), pelo que não foram considerados esses resultados (sendo duas diabéticas, uma diabética inaugural e um controlo).

**Tabela 6:** Número de crianças com Lindano doseável na plasma, concentração de Lindano µg/l (mediana, mínimo e máximo).

Grupo	N	Mediana	Mínimo	Máximo
<b>Diabetes</b>	11	7,1400	2,72	15,93
<b>Diabetes inaugural</b>	1	9,7300	9,73	9,73
<b>Controlos</b>	4	5,3550	2,37	15,93
<b>Total</b>	16	6,9150	2,37	15,93

Não há diferenças significativas entre os grupos com lindano > LOQ ( $p=0,302$  *Kruskal wallis*).

### Discussão

O lindano foi produzido na Europa desde os anos 50 do século passado até aos anos 90. A sua produção implicava um elevadíssimo desperdício, e por cada tonelada de lindano produzido, eram geradas cerca de 6 a 10 toneladas de isómeros ineficazes. Consequentemente, a poluição ambiental provocada pela sua síntese foi extremamente elevada. Espanha foi um dos países produtores deste pesticida<sup>179</sup>. A sua utilização no continente europeu durante essas 4 décadas rondou as centenas de milhar de toneladas, tendo sido o seu uso proibido a partir de 2008<sup>179</sup>. No ano seguinte, o lindano e o alfa e beta-HCH foram incluídos na Convenção de Estocolmo de modo a procurar incentivar a eliminação total da utilização destes químicos<sup>79</sup>. Não há, no entanto, até à data, qualquer legislação europeia relativamente aos solos contaminados com este produto. Atualmente, só existe referenciada uma fábrica a produzir lindano em todo o mundo, localizada na Índia, e com objetivos farmacêuticos<sup>180</sup>.

O lindano foi recentemente classificado como carcinogénio e associado a risco de Linfoma Não-*Hodgkin*<sup>181</sup>. A exposição aguda a esta substância em doses elevadas apresenta uma toxicidade importante, com múltiplas manifestações, desde cefaleias e tonturas a náuseas, vômitos, diarreia, convulsões e até morte<sup>179</sup>.

O contacto crónico, em doses mais baixas, determina efeitos respiratórios, cardiovasculares, hematológicos, hepáticos e endócrinos<sup>151,182</sup>. A situação atual na Europa não se encontra totalmente esclarecida, em termos de contaminação ambiental.

Em Portugal, não houve fábricas de produção de lindano, mas na vizinha Espanha houve várias. A mais próxima da nossa região localizava-se na Galiza e esteve operacional de 1947 a 1964. Embora

pareça muito distante no tempo a cessação da sua atividade, em 1999, um estudo realizado nesta região mostrou concentrações elevadas de isómeros de HCH quer no solo quer em água destinada ao consumo<sup>179</sup>.

Não existem muitos trabalhos sobre doseamentos de pesticidas organoclorados em idade pediátrica, mas os que existem apontam para valores aparentemente mais elevados, mesmo em países em que o seu uso se encontra proibido. Em 2015, um estudo realizado na Turquia, e em que se pesquisaram 29 pesticidas organoclorados, entre os quais, Lindano e seus isómeros, assim como DDE, em recém-nascidos oriundos de Istambul, entre 2010 e 2012, encontraram níveis doseáveis de vários destes químicos, com valores elevados de DDE e DDT<sup>183</sup>.

Uma das dificuldades nestes doseamentos é o facto de, por estes compostos terem lipofilia, serem mais facilmente doseados na gordura, do que a nível sérico ou urinário. Se num adulto a possibilidade de dosear estes elementos na gordura é difícil, em idade pediátrica é praticamente impossível. A complexidade inerente aos seus doseamentos tem levado os investigadores a procurarem métodos alternativos, nomeadamente a sua pesquisa no pelo de animais de experiência, sendo esta uma forma promissora<sup>184</sup>.

A relação entre a exposição ao lindano e o desenvolvimento de alteração imunológica está por esclarecer. Os poucos trabalhos publicados reportam-se a investigação animal. Estes apontam, no entanto, para a possibilidade de este organoclorado desencadear alterações na resposta imunológica<sup>185</sup>. No entanto, a ligação entre lindano e DMT2 parece cada vez mais consensual<sup>186,187</sup>.

A pequena dimensão da amostra analisada não permitiu tirar conclusões relativamente à associação entre a presença de lindano e um possível agravamento da intolerância à glicose.

Um facto a ter em consideração é que, embora a utilização de lindano como pesticida seja proibida no nosso país, ele continua a ser encontrado no plasma de 37% das crianças diabéticas, 29% dos controlos e 17% das crianças com diabetes inaugural. Considerando que este produto apresenta lipofilia, é expectável que ele se encontre numa percentagem muito maior no tecido adiposo, amostra não avaliada neste estudo.

Estudos de avaliação da presença de lindano no meio ambiente corroboram a sua persistência<sup>189</sup>. Coscollá e colaboradores encontraram também níveis apreciáveis de pesticidas no ar ambiente

de crianças e adultos de uma comunidade rural francesa, em 2017<sup>188</sup>. Existem também vários trabalhos portugueses que analisam a presença de lindano no meio ambiente, sobretudo aquático, confirmando efetivamente a sua presença, mesmo depois da sua proibição como pesticida<sup>190</sup>. Cruzeiro e colaboradores pesquisaram a presença de 54 pesticidas nas águas do estuário do Rio Douro, tendo encontrado valores detetáveis e quantificáveis de 96% destes, entre os quais, DDE, Lindano e os seus isómeros alfa e beta. Muitos dos poluentes encontrados estavam acima dos níveis recomendados pela União Europeia e, relativamente a outros, a sua utilização é mesmo proibida<sup>191</sup>.

Até 2008, era possível utilizar lindano como escabicida, mas a partir dessa data, a sua utilização com este fim foi banida, pelo que, tendo em conta que as amostras para este projeto foram colhidas entre 2012 e 2013, é pouco provável que estes achados reflitam usos anteriores com este objetivo, tanto mais tendo em consideração a sua semi-vida<sup>192</sup>.

É também importante considerar a possibilidade que compostos como o lindano possam, à semelhança do que acontece com muitos alteradores endócrinos, iniciar a sua atividade disruptiva in útero, determinando um maior risco obesogénico e/ou de intolerância à glicose. Nesse caso, a sua pesquisa no momento de diagnóstico da doença será já tardia.

Relativamente ao DDT, e seus metabolitos DDD e DDE, é de certo modo curioso que não tenham sido encontrados em nenhuma amostra.

Mesmo em países que não utilizam DDT há muitos anos, este produto e os seus metabolitos continuam a ser encontrados nos seus habitantes. Para além da sua conhecida persistência ambiental, tem-se procurado perceber se existem outras razões para este facto. Uma delas é que, sendo este composto transportado sob a forma de pequenas partículas aéreas, as correntes de ar existentes na atmosfera expliquem a sua presença a longas distâncias da sua emissão<sup>193</sup>. No entanto, pensa-se que a principal forma de contaminação do ser humano residente em áreas em que o DDT foi banido, seja através da alimentação, nomeadamente através da ingestão de peixe<sup>194</sup>.

Trabalhos publicados no nosso país demonstram a presença de DDE no tecido adiposo de indivíduos adultos sujeitos a cirurgia bariátrica<sup>195</sup>. Uma vez que este composto tem bio-acumulação, é possível que seja mais facilmente mensurável em adultos do que em crianças. No entanto, foi possível encontrar DDE em amostras séricas de crianças pré-púberes espanholas, em concentrações apreciáveis<sup>196</sup>.

Mesmo em Espanha, a avaliação de alguns seres vivos que são considerados espécies bio-indicadoras da presença de compostos poluentes, mostram diferentes níveis de POP, de acordo com a sua localização. O DDT foi encontrado em níveis mais elevados junto a populações urbanas e na foz dos rios, mas o seu doseamento entre 2000 e 2013 baixou significativamente<sup>197</sup>. O trabalho publicado em 2017 e que pesquisou a presença de DDE no rio Douro confirmou também a sua presença, e em todas as amostras os níveis foram superiores ao LOQ<sup>191</sup>.

Uma hipótese para explicar a ausência destes compostos na nossa amostra é a de que haja diferenças regionais significativas, nomeadamente no que diz respeito à utilização prévia de pesticidas ou aplicação mais rígida das normas de utilização dos mesmos. Grande parte da população seguida na Unidade de Endocrinologia Pediátrica provem de áreas não urbanas e fora do distrito do Porto. Na população americana também foram encontradas diferenças importantes no doseamento de pesticidas organoclorados em diferentes regiões<sup>198</sup>. Apesar disto, é importante considerar a possibilidade da sua existência dado que estudos em modelos animais mostram que este composto está efetivamente presente de modo significativo em indivíduos obesos, associando-se a um perfil metabólico de risco<sup>199</sup>. Ou seja, o facto de não se ter encontrado DDE doseável no plasma destas crianças, não quer dizer que ele não possa estar presente no seu tecido adiposo e influenciar o seu perfil metabólico.

### Conclusões

É possível encontrar lindano no plasma de crianças portuguesas pré-púberes, nascidas depois da proibição da utilização deste produto, quer como escabicida, quer como pesticida. O mesmo não sucedeu com o DDT ou os seus metabolitos, os quais não foram encontrados em nenhuma criança.

Não foi possível encontrar associação entre a sua presença e o diagnóstico de DMT1 ou o agravamento do controlo metabólico da doença, o que poderá dever-se ao reduzido tamanho amostral, assim como ao facto do seu doseamento ter sido sérico.



## 3.2. Factores de Risco Preditivo de Complicações

Adultos com o diagnóstico de DMT1 em idade pediátrica têm um risco aumentado de morbilidade e mortalidade cardiovascular<sup>200</sup>. Quando um indivíduo diagnosticado com diabetes enquanto criança, atinge os 55 anos de idade, a mortalidade provocada por patologia cardiovascular é de 55%, comparativamente a 8% nos homens e 4% nas mulheres não diabéticos<sup>74</sup>. Havendo uma incidência de DMT1 em idades cada vez mais precoces, é de esperar que o risco das complicações desta doença surjam também mais cedo.

A doença cardiovascular engloba a doença coronária, cerebrovascular ou periférica e todas elas surgem mais precocemente no diabético tipo 1 relativamente à população geral<sup>79</sup>. Apesar de se ter este conhecimento, ainda há muito para investigar acerca da fisiopatologia deste fenómeno<sup>79</sup>.

Por outro lado, muitas das nossas atitudes são extrapoladas de conhecimentos adquiridos há mais de uma década, em que a realidade era bastante diferente da atual, nomeadamente no que respeita às formas de tratamento das crianças diabéticas, e mesmo aos objetivos que regem o seu seguimento. Assim, muitas das crianças usam atualmente sistemas de infusão contínua de insulina, procurando-se manter a maior estabilidade glicémica possível, e o objetivo é manter a HbA1c < 7,5%. A ADA (*American Diabetes Association*) só a partir de 2016 recomendou este valor, independentemente da idade da criança. É de esperar portanto, que haja uma mudança positiva no futuro destes indivíduos.

Nos últimos anos, tem surgido bastante investigação nesta área visando questões, como compreender melhor os efeitos adversos da hiperglicemia, a prevalência e o tipo de anomalias do perfil lípidico, o papel prognóstico da insuficiência renal e a importância da tensão arterial<sup>79</sup>.

O facto de, simultâneamente com o aumento da incidência e prevalência de DMT1 ter ocorrido um aumento da obesidade condiciona também uma mudança fulcral na abordagem destas crianças. É natural que se associem os factores de risco de ambas as condições, estando estas presentes no mesmo indivíduo.

### 3.2.1. Factores de Risco de Doença Cardiovascular

A DMT1 associa-se a maior risco de patologia aterosclerótica, sobretudo após cerca de 15 anos de doença<sup>201</sup>. Trabalhos publicados antes da epidemia de obesidade que surgiu de forma explícita neste século, mostravam que os indivíduos com DMT1 não apresentavam tipicamente insulinoresistência ou aspetos associados a esta, como HDL baixo e TG elevados<sup>202</sup>. Mesmo sem estas alterações, o risco de doença cardiovascular era bastante óbvio<sup>201</sup>.

Vários estudos foram demonstrando a presença de outros factores de risco, associados à diabetes, nomeadamente albuminúria,<sup>203</sup> insulinoaterapia não intensiva,<sup>204</sup> duração da doença superior a 15 anos<sup>205</sup>, deficiente controlo glicémico<sup>206</sup>, insulinoresistência ou síndrome metabólico<sup>207</sup>.

A noção da existência de um grupo cada vez maior de crianças e jovens que associam DMT1 com excesso de peso ou mesmo obesidade<sup>208</sup> e que isso levaria à partida, a um seguimento diferente destes, levou a que se realizasse um estudo sobre a presença de síndrome metabólico em raparigas adolescentes com DMT1.



Cíntia Castro-Correia\*, Rita Santos-Silva, Marta Pinheiro, Carla Costa and Manuel Fontoura

## Metabolic risk factors in adolescent girls with type 1 diabetes

<https://doi.org/10.1515/jpem-2018-0053>

Received January 29, 2018; accepted April 16, 2018

### Abstract

**Background:** The incidence of pediatric metabolic syndrome (MS) has progressively increased. The incidence of type 1 diabetes mellitus (T1DM) has also increased. Thus, some children and adolescents with T1DM exhibit MS parameters. The aim of the study was to evaluate the presence of MS parameters in female adolescents with T1DM based on their nutritional status.

**Methods:** We evaluated 44 adolescents with T1DM (consecutive non-randomized sample) aged between 14 and 18 years, who were on intensive therapy with insulin. Patients were subdivided according to their body mass index (BMI). Variables evaluated include: age, age at diagnosis, weight, height, BMI, abdominal circumference, blood pressure, glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>), abdominal and pelvic ultrasound and lipoprotein profile. Gynecological history data were also collected.

**Results:** Lipid profile changes were identified in 32% of overweight or obese girls and in 23% of those with an adequate weight. Hypertension (HT) was observed in 19% of overweight or obese girls and in 14% of those with a BMI  $\geq$  85th percentile (Pc). The only statistically significant difference between the groups was the presence of abdominal adiposity. All other features, including the presence of dyslipidemia, HT, abdominal adiposity, non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and polycystic ovarian syndrome (PCOS), were present in both groups.

**Conclusions:** Although being overweight and/or obese aggravates the risk of cardiovascular disease, MS is already present in many young adolescents with T1DM of normal weight. It is necessary that MS risk factors are

routinely evaluated in all diabetic adolescents, including those with an adequate BMI.

**Keywords:** dyslipidemia; metabolic syndrome; obesity; polycystic ovary syndrome; type 1 diabetes.

### Introduction

The incidence of pediatric metabolic syndrome (MS) has steadily increased in recent years [1]. There is no consensus on the definition of pediatric MS, which has been the subject of discussion with a number of proposed changes. Since 2007, the set of factors published by the International Diabetes Federation (IDF) that define MS is considered the most appropriate (Table 1) [2].

These criteria are used for children and adolescents up to the age of 16 years. The criteria for adults are used for those aged 16 years or older [2]. The diagnosis implies the presence of obesity and at least two of the other parameters listed in Table 1.

This definition of MS was established to allow the implementation of measures to prevent the development of type 2 diabetes or cardiovascular disease [2].

Waist circumference (WC) is the main parameter of this definition because it represents an independent risk factor for insulin resistance and the presence of dyslipidemia and hypertension (HT) [3, 4].

In parallel with the increased global incidence of MS in children (reflecting an increase in excess weight and obesity), a significant increase in the incidence of type 1 diabetes mellitus (T1DM) has been observed in this age group [5]. Thus, some children and adolescents with T1DM may have some MS factors. In these patients, the use of functional and intensive insulin therapy has reduced the development of microangiopathic pathologies but does not prevent the progression of pathologies associated with other cardiovascular risk factors [6].

Patients with T1DM have an increased cardiovascular risk, and the use of MS criteria has been proposed to identify subgroups of patients at even greater risk [7].

During puberty and adolescence, there is a temporary and physiological increase of insulin resistance [8]. Adolescent girls with T1DM exhibit an increased incidence of metabolic risk factors, such as HT [9] and non-alcoholic

\*Corresponding author: Cíntia Castro-Correia, MD, Pediatric Endocrinology Unit, Pediatrics Service, São João Integrated Pediatric Hospital, Alameda Hernani Monteiro, University of Porto Medical School, Hospital S João, Serviço de Pediatria, 4200 Porto, Portugal, E-mail: cintiacastro-correia@hotmail.com

Rita Santos-Silva, Carla Costa and Manuel Fontoura: Pediatric Endocrinology Unit, Pediatrics Service, São João Integrated Pediatric Hospital, Alameda Hernani Monteiro, University of Porto Medical School, Porto, Portugal

Marta Pinheiro: Pediatric Service, São João Integrated Pediatric Hospital, Alameda Hernani Monteiro, Porto, Portugal

**Table 1:** Factors that define MS according to the International Diabetes Federation (IDF).<sup>a</sup>

Age	Obesity	TG	HDL	BP	Glycemia
10–16 years	WC ≥ 90% or adult cut-off is lower	>150 mg/dL ≥1.7 mmol/L	<40 mg/dL <1.03 mmol/L	Systolic ≥130/diastolic ≥85 mmHg	≥100 mg/dL (5.6 mmol/L)
>16 years	Central obesity (defined as WC ≥ 94 cm for men and ≥80 cm for women)	≥150 mg/dL	<40 mg/dL in men and <50 mg/dL in women or specific treatment	Systolic ≥130/diastolic ≥85 mmHg or treatment of previously diagnosed HT	Fasting glycemia ≥100 mg/dL (5.6 mmol/L) or previously diagnosed type 2 diabetes

<sup>a</sup>Adapted from Ref. [2]. WC, waist circumference; HDL, high-density lipoprotein; BP, blood pressure; HT, hypertension; TG, triglycerides.

steatohepatitis (NASH) [10]. The relationship between T1DM and dyslipidemia is not clear, and it seems that the appearance of lipid changes depends more on poor metabolic control [11, 12].

In the USA, the TEENS study [1] demonstrated that 17% of children and adolescents with T1DM are overweight, and 10% are obese [1]. Similarly, the SEARCH [13] study demonstrated that approximately 34% of young people with T1DM are obese or overweight, and this percentage is similar to that observed in the general population [13].

Polycystic ovarian syndrome (PCOS) is also more frequently diagnosed in women with T1DM. However, insufficient studies at younger ages are available to confirm that the same finding is true in adolescents with this condition.

The objective of this study was to evaluate the presence of MS parameters in female adolescents with T1DM based on their nutritional status.

## Materials and methods

From a total of 302 patients at a pediatric endocrinology unit in a tertiary center, 44 adolescents with T1DM diagnosed for at least 2 years were evaluated according to the following inclusion criteria:

Diagnosis of T1DM (with the presence of anti-Gad or anti-insulin antibodies at the time of diagnosis), age between 14 and 18 years and undergoing intensive insulin therapy either in the form of multiple daily administrations or with continuous infusion of insulin.

Young women with other associated pathologies or those who used other types of medication were excluded.

Patients were included by means of a consecutive non-randomized sampling and were subdivided into two groups according to their body mass index (BMI): normal or greater than the 85th percentile (Pc).

The following variables were evaluated in all patients: age, age at diagnosis, weight, height, BMI in kg/m<sup>2</sup>, WC in cm, blood pressure (BP) in mmHg, glycated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) reported as a percentage, abdominal and pelvic ultrasound and lipoprotein profile, which included total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol and triglycerides (TG).

Gynecological history data, including age at pubarche, thelarche and menarche and regularity of periods, were collected from all patients.

The same observer performed all evaluations. Weight was evaluated using an electronic scale with an accuracy of 100 g. Stature was evaluated using a rigid stadiometer with 0.1-cm precision in orthostasis. WC was determined using a tape measure after expiration, measuring the midpoint between the edge of the lowest rib and the iliac crest.

BP was evaluated by obtaining three measurements and using the lowest one. HbA<sub>1c</sub> was determined by the method of immunoagglutination inhibition using a DCA 2000 apparatus (Bayer) by capillary puncture, and the lipoprotein profile was calculated from a venous blood sample taken after fasting for at least 12 h.

The project was approved by the Institutional Ethics Committee, and all patients' parents/guardians signed an informed consent form prior to the commencement of the study.

## Data analysis

BMI was assessed according to the World Health Organization criteria, namely, individuals above Pc85 for each age group were characterized as having excess weight. The lipid profile was assessed according to the criteria of the American Diabetes Association, namely, abnormal values of LDL > 100 mg/dL; HDL < 35 mg/dL or TG > 150 mg/dL. BC > Pc95 for age and sex indicated the presence of HT according to the current recommendations [15].

The investigation of NASH was based on the evaluation of hepatic cytolysis markers (aspartate aminotransferase [AST], alanine aminotransferase [ALT],  $\gamma$ -glutamyltransferase [ $\gamma$ -GT]) and/or the evaluation of abdominal ultrasound data by the same observer.

The diagnosis of PCOS was based on recommendations from the Endocrine Society and the Rotterdam criteria, i.e. the presence of at least two of the following findings: chronic oligoovulation or anovulation, clinical and/or biochemical hyperandrogenism and ovarian cysts.

## Results

In total, 42 adolescents with type 1 diabetes were evaluated. Of these adolescents, 24 had a normal BMI (Group 1), and 18 were overweight or obese (Group 2). The mean ages of these two groups were identical. In addition, age at menarche and HbA<sub>1c</sub> were also equivalent in both groups (Table 2). The only significant difference was found in the

Table 2: Patients' characteristics.

	Group 1 BMI < Pc85	Group 2 BMI ≥ Pc85	p-Value
n	24	18	
Age, years – mean, SD	17.9, 1.7	17.3, 1.7	0.26 <sup>a</sup>
Age at menarche, years – mean, SD	12.6, 1.9	12.1, 1.6	0.49 <sup>a</sup>
HbA <sub>1c</sub> , % – median, DP	8.5, 1	8.7, 1.3	0.63 <sup>a</sup>
Duration of DM, years – mean, SD	10.4, 3.7	7.9, 3.6	0.037 <sup>a</sup>
Total cholesterol, mg/dL (median; Pc25–Pc75)	176 (142–196)	170 (151–197)	0.85 <sup>b</sup>
HDL cholesterol, mg/dL (median; Pc25–Pc75)	55 (48–65)	55.5 (45–62.7)	0.85 <sup>b</sup>
LDL cholesterol, mg/dL (median; Pc25–Pc75)	95 (76–113)	94 (81.5–120.5)	0.85 <sup>b</sup>
Triglycerides, mg/dL (median; Pc25–Pc75)	72 (54–112)	69.5 (54.3–81.8)	0.40 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>t-Test for independent samples. <sup>b</sup>Non-parametric test.

Table 3: Cholesterol, LDL, HDL, TG concentrations, hypertension, abdominal adiposity, NASH and PCOS characteristics according to BMI.

	Group 1	Group 2	p-Value
Cholesterol > 170	12 (50%)	8 (44%)	0.89 <sup>a</sup>
LDL > 110 mg/dL	8 (33%)	6 (33%)	0.86 <sup>a</sup>
HDL with MS characteristics	4 (17%)	3 (17%)	0.62 <sup>b</sup>
TG with MS characteristics	1 (4%)	3 (17%)	0.18 <sup>b</sup>
HT	4 (14%)	3 (19%)	0.08 <sup>b</sup>
Abdominal adiposity	5 (21%)	12 (67%)	0.003 <sup>a</sup>
NASH	1 (4%)	2 (11%)	0.43 <sup>b</sup>
PCOS	5 (21%)	3 (17%)	0.42 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Pearson's chi-square  $\chi^2$  test. <sup>b</sup>Fisher's exact test.

number of years with DM, which was increased in young women with a BMI < Pc85.

Lipid profile alterations were observed in 32% of overweight or obese girls and in 23% of those with an adequate weight. HT was observed in 19% of overweight or obese girls and in 14% of those with a BMI < Pc85. The only statistically significant difference between the groups was the presence of abdominal adiposity. All other features, including the presence of dyslipidemia, HT, abdominal adiposity, NASH and PCOS, were present in both groups. Thus, the groups overlapped (Table 3).

## Discussion

The relationship between DM with poor metabolic control and increased cardiovascular mortality is well known [16, 17].

MS is also a risk factor for cardiovascular disease; therefore, the association of these two pathologies implies a significant cumulative risk [18].

The studied population of adolescents with T1DM exhibits poor metabolic control despite receiving intensive functional insulin therapy either in the form of multiple daily administrations or a continuous insulin infusion system. The difficulties in the treatment of T1DM in this age group are known. Specifically, the increase of autonomy in the context of the various challenges of adolescence is not always accompanied by desirable metabolic control [19].

The duration of the disease is not a factor of poor metabolic control given that HbA<sub>1c</sub> levels do not change over the years. Adolescents with T1DM may be at an increased risk of weight gain due to increased obesity in the general population and because these individuals are treated with intensive insulin [20]. Hyperinsulinism can trigger hypoglycemia, which can lead to an increase in weight when corrected excessively. However, Baskaran et al. [21] evaluated a group of adolescents with T1DM and reported a percentage of excess weight and obesity similar to that in the general population.

The use of a continuous insulin infusion system seems to decrease the likelihood of excessive weight gain that was occasionally observed with multiple delivery regimens, reflecting a more physiological insulin delivery [21].

Consistent with that demonstrated at the global level, there is also an increase in the incidence of pediatric obesity in Portugal despite the scarcity of published studies [22, 23].

In patients with T1DM with good metabolic control, the incidence of dyslipidemia is the same as that observed in the general population [24]. Poor metabolic control with increasing HbA<sub>1c</sub> levels is associated with elevated LDL cholesterol levels and therefore increased atherogenic risk [11].

There is no consensus regarding the limits of lipid profile parameters that should be achieved in the

treatment of children and adolescents with diabetes. However, it is essential to maintain lipid profile levels that have the lowest risk of developing cardiovascular disease through measures that include a hypolipid diet, increased physical activity and strict metabolic control from an early stage of treatment [24].

In the studied adolescents with T1DM, significant lipid profile alterations were observed in both groups of patients regardless of their BMI. This finding reiterates the importance of vigilant monitoring of this lipid profile in adolescents with T1DM, regardless of their BMI.

Although the presence of HT associated with T1DM is associated with excess weight/obesity in the literature [11], we observed identical HT values in both groups of our sample, indicating that HT is not exclusively dependent on an increase in BMI.

As noted in the diabetic adolescents studied, HbA<sub>1c</sub> levels were elevated, indicating poor metabolic control. Given that a relationship between these levels and the incidence of HT has been described, this finding may justify the highest BP values found in patients with BMI < Pc85 [25, 26].

NASH is defined by the presence of fatty deposits of adipose tissue and includes more aggressive situations, such as steatohepatitis, fibrosis, cirrhosis and, in some cases, hepatocellular carcinoma [27]. The presence of NASH is often described in patients with DM or MS or in those who are overweight or obese [28, 29].

The risk of NASH increases with the number of parameters that fit the diagnosis of MS [30] and the ethnic group given the particular tendency among some populations for the onset of this condition [31]. As with other parameters in the studied patients, the presence of NASH was more pronounced in the overweight or obese T1DM group. However, NASH is also present in patients of normal weight. Thus, a statistically significant difference was not observed.

PCOS frequently occurs during adolescence and represents the most frequent cause of chronic anovulation. Although it may appear in adolescents who have a normal BMI, PCOS is most often diagnosed among those who are overweight and/or obese and exhibit insulin resistance [32]. However, no significant differences in this parameter were found between the two groups.

In the group of diabetic adolescents with a normal BMI (<Pc85), 17% had less than desirable HDL values, 4% had hypertriglyceridemia and 14% had HT. This group also includes adolescents with biochemical and/or ultrasound criteria for NASH and PCOS. These results have implications because they justify and reinforce the need for systematic screening of these cardiovascular

risk factors in all young T1DM patients, even when BMI is normal.

## Conclusions

Although being overweight and/or obese aggravates the risk of cardiovascular disease, this condition is already present in many adolescents with T1DM of normal weight. It is necessary that MS risk factors are routinely evaluated in all diabetic adolescents, even in those with a normal BMI.

**Author contributions:** Prof. Manuel Fontoura is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Cíntia Castro-Correia wrote the manuscript and researched data. Rita Santos-Silva researched data and contributed to discussion. Marta Pinheiro researched data. Carla Costa contributed to discussion and reviewed the manuscript. Manuel Fontoura reviewed the manuscript. All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

**Research funding:** None declared.

**Employment or leadership:** None declared.

**Honorarium:** None declared.

**Competing interests:** The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

## References

1. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014;384:766–81.
2. Zimmet P, Alberti KG, Kaufman F, Tajima N, Silink M, et al. The metabolic syndrome in children and adolescents – an IDF consensus report. *Pediatr Diabetes* 2007;8:299–306.
3. Lee S, Bacha F, Gungor N, Arslanian SA. Waist circumference is an independent predictor of insulin resistance in black and white youths. *J Pediatr* 2006;148:188–94.
4. Jolliffe CJ, Janssen I. Development of age-specific adolescent metabolic syndrome criteria that are linked to the Adult Treatment Panel III and International Diabetes Federation criteria. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:891–8.
5. Patterson CC, Gyurus E, Rosenbauer J, Cinek O, Neu A, et al. Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989–2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase. *Diabetologia* 2012;55:2142–7.

6. Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, et al. The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh epidemiology of diabetes complications study experience. *Diabetes* 2006;55:1463–9.
7. Gingras V, Leroux C, Fortin A, Legault L, Rabasa-Lhoret R. Predictors of cardiovascular risk among patients with type 1 diabetes: a critical analysis of the metabolic syndrome and its components. *Diabetes Metab* 2017;43:217–22.
8. Moran A, Jacobs DR, Steinberger J, Steffen LM, Pankow JS, et al. Changes in insulin resistance and cardiovascular risk during adolescence: establishment of differential risk in males and females. *Circulation* 2008;117:2361–8.
9. Pall D, Kiss I, Katona E. Importance of ambulatory blood pressure monitoring in adolescent hypertension. *Kidney Blood Press Res* 2012;35:129–34.
10. Regnell SE, Peterson P, Trinh L, Broberg P, Leander P, et al. Magnetic resonance imaging reveals altered distribution of hepatic fat in children with type 1 diabetes compared to controls. *Metabolism* 2015;64:872–8.
11. Maahs DM, Dabelea D, D'Agostino RB Jr, Andrews JS, Shah AS, et al. Glucose control predicts 2-year change in lipid profile in youth with type 1 diabetes. *J Pediatr* 2013;162:101–7.
12. Reh CM, Mittelman SD, Wee CP, Shah AC, Kaufman FR, et al. A longitudinal assessment of lipids in youth with type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes* 2011;12:365–71.
13. Liu LL, Lawrence JM, Davis C, Liese AD, Pettitt DJ, et al. Prevalence of overweight and obesity in youth with diabetes in USA: the SEARCH for Diabetes in Youth study. *Pediatr Diabetes* 2010;11:4–11.
14. Escobar-Morreale HF, Roldán-Martín MB. Type 1 diabetes and polycystic ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care* 2016;39:639–48.
15. Flynn JT, Kaelber DC, Baker-Smith CM, Blowey D, Carroll AE, et al. Clinical practice guideline for screening and management of high blood pressure in children and adolescents. *Pediatrics* 2017;140:e20171904.
16. Lind M, Svensson AM, Kosiborod M, Gudbjornsdottir S, Pivodic A, et al. Glycemic control and excess mortality in type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2014;371:1972–82.
17. Writing Group for the DCCT/EDIC Research Group, Orchard TJ, Nathan DM, Zinman B, Cleary P, et al. Association between 7 years of intensive treatment of type 1 diabetes and long-term mortality. *J Am Med Assoc* 2015;313:45–53.
18. Higgins V, Adeli K. Pediatric metabolic syndrome: pathophysiology and laboratory assessment. *EJIFCC* 2017;28:25–42.
19. Gerstl EM, Rabl W, Rosenbauer J, Grobe H, Hofer SE, et al. Metabolic control as reflected by HbA1c in children, adolescents and young adults with type-1 diabetes mellitus: combined longitudinal analysis including 27,035 patients from 207 centers in Germany and Austria during the last decade. *Eur J Pediatr* 2008;167:447–53.
20. Kapellen TM, Gausche R, Dost A, Wiegand S, Flechtner-Mors M, et al. Children and adolescents with type 1 diabetes in Germany are more overweight than healthy controls: results comparing DPV database and CrescNet database. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2014;27:209–14.
21. Baskaran C, Volkening LK, Diaz M, Laffel L. A decade of temporal trends in overweight/obesity in youth with type 1 diabetes after the Diabetes Control and Complication Trial (DCCT). *Pediatr Diabetes* 2015;16:263–70.
22. Padez C, Mourão I, Moreira P, Rosado V. Prevalence and risk factors for overweight and obesity in Portuguese children. *Acta Paediatr* 2005;94:1550–7.
23. Gouveia E, Freitas D, Maia J, Beunen G, Claessens A, et al. Prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes da Região Autónoma da Madeira, Portugal. *Acta Pediatr Port* 2009;40:245–51.
24. Katz M, Giani E, Laffel L. Challenges and opportunities in the management of cardiovascular risk factors in youth with type 1 diabetes: lifestyle and beyond. *Curr Diab Rep* 2015;15:119.
25. Rodriguez BL, Dabelea D, Liese AD, Fujimoto H, Waitzfelder B, et al. Prevalence and correlates of elevated blood pressure in youth with diabetes mellitus: the SEARCH for diabetes in youth study. *J Pediatr* 2010;157:245–51.
26. Chatterjee M, Speiser PW, Pellizzarri M, Carey DE, Fort P, et al. Poor glycemic control is associated with abnormal changes in 24-hour ambulatory blood pressure in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009;22:1061–7.
27. Sayiner M, Koenig A, Henry L, Younossi ZM. Epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in the United States and the rest of the world. *Clin Liver Dis* 2016;20:205–14.
28. Calzadilla Bertot L, Adams LA. The natural course of non-alcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci* 2016;17:E774.
29. Younossi ZM, Stepanova M, Negro F, Hallaji S, Younossi Y, et al. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine* 2012;91:319–27.
30. Kanwar P, Kowdley KV. The metabolic syndrome and its influence on nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis* 2016;20:225–43.
31. Benedict M, Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: an expanded review. *World J Hepatol* 2017;9:715–32.
32. Diamanti-Kandarakis E, Dunaif A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocrine Rev* 2012;33:981–1030.

### 3.2.1.1. Factores de Risco - Hiperlipidemia

Tendo em conta a associação entre DMT1 e risco cardiovascular, é recomendada uma avaliação de rotina do perfil lipídico destes pacientes, assim como intervenção nutricional precoce no sentido de minimizar o risco de dislipidemia<sup>209</sup>. É inclusivamente recomendado que indivíduos com DMT1 há mais de 15 anos, sejam tratados como diabéticos Tipo 2<sup>209</sup>.

O estudo SEARCH publicado em 2009 e referente ao perfil lipídico de crianças e jovens com DMT1 foi muito importante porque chamou a atenção para várias questões. Uma delas é que indubitavelmente, um melhor controlo glicémico determina um melhor perfil lipídico, menos aterogénico. Mas também mostrou que jovens com DMT1 e uma HbA1c < 7,5%, apesar de um perfil lipídico sem diferenças significativas relativamente aos controlos, apresentavam maior quantidade de partículas densas pequenas de LDL (*Low-density Lipoprotein*) e apolipoproteína B<sup>94</sup>.

Ora, muito embora as LDL tenham um papel chave no desenvolvimento e progressão da aterosclerose e doença cardiovascular, dentro destas partículas<sup>210</sup> existem várias sub-classes, de diferentes tamanhos e densidade. As pequenas e densas são as que efetivamente apresentam maior potencial aterogénico<sup>210</sup>. Isto abriu caminho a que se ponderasse que a determinação apenas do perfil lipídico, como é habitualmente realizado na clínica, pudesse não ser suficiente para explicar o risco cardiovascular observado nos DMT1.

Os ácidos gordos livres (FFA – *Free Fatty Acids*) são fatores de risco conhecidos de patologia cardiovascular e associam-se a síndrome metabólico<sup>211,212</sup>. Para além de se associarem a mecanismos de insulinoresistência, são capazes de induzir efeitos inflamatórios<sup>213,214</sup>. Parece haver assim a noção que a presença de algum tipo de ácidos gordos pode desencadear disfunção endotelial<sup>215</sup>.

A disfunção endotelial surge como resultante da insulinoresistência, do stress oxidativo e da carga inflamatória associadas à presença de alguns ácidos gordos livres<sup>216</sup>. A Diabetes poderia determinar a elevação de alguns FFA, provocando um efeito direto em fatores de transcrição que desencadeiam inflamação e stress oxidativo<sup>217</sup>. Além deste mecanismo, os FFA facilitam a apoptose de células endoteliais, o que mais uma vez, contribui para a disfunção endotelial<sup>218</sup>. Os ácidos gordos ómega 3 diminuem os TG, reduzindo a secreção hepática de lipoproteínas ricas em TG<sup>219</sup>.

Uma das questões que se colocou neste projecto foi a de poder haver uma relação entre a presença de algum tipo de ácidos gordos e o desencadear da autoimunidade que provoca o aparecimento

da DMT1, dado se saber que alguns ácidos gordos têm realmente um papel no fenómeno da inflamação. Uma vez que as doenças autoimunes são elas próprias a demonstração de uma desregulação de processos inflamatórios, procurou-se pesquisar uma eventual relação entre a presença de ácidos gordos com um eventual perfil inflamatório e o aparecimento da DMT1. Isto, considerando que, embora quando o diagnóstico de DMT1 se faça, já se tenha iniciado o processo de destruição auto-imune das células Beta meses ou anos antes, nos primeiros meses de doença, o fenómeno de insulite ainda se mantém, até que efetivamente a destruição destas células seja praticamente total.





## Research Article

# The Fatty Acid Profile in Patients with Newly Diagnosed Diabetes: Why It Could Be Unsuspected

C. Castro-Correia,<sup>1</sup> S. Sousa,<sup>2</sup> S. Norberto,<sup>3</sup> C. Matos,<sup>4</sup> V. F. Domingues,<sup>2</sup>  
M. Fontoura,<sup>1</sup> and C. Calhau<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup>Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital Pediátrico Integrado, Centro Hospitalar S. João, Faculty of Medicine, University of Porto, 4200 Porto, Portugal

<sup>2</sup>REQUIMTE/LAQV-GRAQ, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, 4200-072 Porto, Portugal

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Porto, Centro de Investigação Médica, 4200-450 Porto, Portugal

<sup>4</sup>Center for Research in Health Technologies and Information Systems (CINTESIS), 4200-450 Porto, Portugal

Correspondence should be addressed to C. Castro-Correia; [cintiacastro-correia@hotmail.com](mailto:cintiacastro-correia@hotmail.com)

Received 19 June 2017; Accepted 10 August 2017; Published 11 September 2017

Academic Editor: Samuel Menahem

Copyright © 2017 C. Castro-Correia et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**Context.** Several studies have shown a link between proinflammatory activity and the presence or deficit of some fatty acids. Inflammation is associated with several diseases including diabetes. **Objective.** To characterize and compare the fatty acids profiles in children with inaugural type 1 diabetes, diabetic children (at least 1 year after diagnosis), and healthy children. **Design.** Plasma fatty acids profiles in children with inaugural diabetes, children with noninaugural diabetes, and controls, all of whom were prepubescent with a BMI < 85th percentile, were evaluated. **Results.** Omega-3 fatty acid levels were higher in recently diagnosed subjects with diabetes than in controls. The ratio of omega-6/omega-3 fatty acids was higher in the control population. Omega-6 fatty acid levels were higher in the nonrecent diabetic subjects than in the children with recently diagnosed diabetes, and the levels were higher in the nonrecent diabetes group compared to the control group. **Conclusion.** Our findings showed higher levels of alpha-linolenic acid, EPA, and DHA, as well as mono- and polyunsaturated fatty acids, in diabetic children. These findings reinforce the importance of precocious nutritional attention and intervention in the treatment of diabetic children.

## 1. Introduction

Type 1 diabetes is an autoimmune disease triggered by the destruction of pancreatic beta cells. It is usually preceded by the emergence of autoimmunity, including anti-GAD antibodies (glutamine decarboxylase). Both genetic and environmental factors contribute to the development of the disease [1].

Several studies have demonstrated a link between proinflammatory activity and the presence or relative deficit of some fatty acids [2, 3]. Thus, a low level of omega-3 fatty acids, which occurs frequently in western diets, appears to promote an inflammatory response. In fact, higher intake of omega-3 fatty acids and a high concentration of these fatty acids in the erythrocyte membrane are associated with a lower risk of developing pancreatic beta-autoimmunity [4].

It is also known that there is a relationship between inflammatory activity and the presence of type 1 diabetes-associated complications such as retinopathy or diabetic nephropathy. A diet rich in omega-3 fatty acids appears to be beneficial through the promotion of greater insulin sensitivity and improved glucose metabolism [5]. These fatty acids decrease inflammation by altering the transcription of genes involved in the inflammatory response (e.g., NF- $\kappa$ B, INF- $\gamma$ ) and by competing with the binding of omega-6 fatty acids to enzymes involved in the synthesis of proinflammatory eicosanoids [6]. Eicosanoids are biologically active lipid mediators that regulate inflammation [7] and include prostaglandins, prostacyclins, thromboxanes, lipoxins, and leukotrienes [8]. The presence of high levels of prostaglandin E2 appears to promote the loss of beta cells and inhibits beta cell proliferation. Prostaglandin E2 also reduces insulin

TABLE 1: Characteristics of participants.

	Type 1 diabetes	New onset diabetes	Controls
Number	23	6	12
M/F ratio	12/11	3/3	7/5
Age (years)	7.15 (4.0–9.7)	7.36 (3.9–9.7)	6.6 (3.6–10.3)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	17.03	16.94	16.97
Duration of disease (years)	3.29 (0.5–7.2)		
HbA1c (%)	8.17 (6.3–10.8)	9.9 (8.2–11.9)	

secretion and insulin sensitivity through its binding to the EP3 receptor [9].

$\alpha$ -Linolenic acid is the primary omega-3 fatty acid present in western diets and is found especially in vegetables, namely, in soy [1]. Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are found in fat fish that is frequently consumed in the Mediterranean diet.

Omega-6 fatty acids promote inflammation. The main acid of this type in the western diet is linoleic acid, which is present mainly in vegetable oils, and arachidonic acid, which is derived from meat.

While the clinical follow-up of children and young people with type 1 diabetes involves the periodic evaluation of their lipid profile, namely, total cholesterol, HDL, LDL, and triglycerides, the concentrations of different types of fatty acids have not been investigated.

To address this gap in knowledge, the authors aimed to study the differences between the fatty acid profiles in children with inaugural type 1 diabetes, diabetic children (at least 1 year after diagnosis), and healthy children.

## 2. Methods

**2.1. Human Sample.** Between 2012 and 2013, we obtained plasma fatty acids profiles from prepubescent children with inaugural diabetes and with a BMI < 85th percentile at the time of their diagnosis ( $N = 8$ ). Ages ranged from 4.8 to 9.6 years (average: 8.47). We also included diabetic children who attended the Pediatric Endocrinology Unit of S. João Hospital ( $N = 34$ ) who were between 2.8 and 10.4 years of age (average: 7.06). Children were excluded if they had a BMI above the 85th percentile, were diagnosed less than six months prior to enrolment, had other associated diseases, or were taking any other medication. Children with a Tanner stage  $\geq 2$  were also excluded.

The control population included children who were scheduled to undergo planned surgical interventions, had no chronic diseases, and were not taking any medication. Children with a BMI > 85th percentile or who were pubescent were also excluded. These children were between 3.5 and 8.6 years of age (average: 6.1) (Table 1).

The study was approved by the hospital's ethics committee. Authorization and informed consent were obtained from the parents of all the children participating in the study.

**2.2. Chemicals and Reagents.** Sodium hydroxide and anhydrous sodium sulfate were obtained from Pronalab® (Lisbon, Portugal); boron trifluoride in methanol (14% in methanol)

and butylated hydroxytoluene (BHT) ( $\geq 99\%$ ) were from Sigma-Aldrich® (St. Louis, USA); *n*-hexane (99%) was from Merck® (Darmstadt, Germany); methanol was from VWR Chemicals Prolabo® (Fontenay-sous-Bois, France); and sodium chloride (99.5%) was from Panreac® (Barcelona, Spain).

**2.3. Determination of Plasma Fatty Acids Profiles by Gas Chromatography Coupled to a Flame Ionization Detector.** To analyze the plasma fatty acids profiles, the boiling point must first be lowered which is achieved by the derivatization of the fatty acids [10]. In this case, sodium methoxide (NaOMe) is used as a catalyst to form fatty acid methyl esters (FAMES) [11] which have a lower boiling point.

The plasma samples were placed in tubes with 20  $\mu$ g of internal standard (C13:0), and then 5 mL of NaOMe (0.5 M) was added, and the tube was vigorously shaken. The samples were heated to 100°C for 10 min and cooled for 5 min on ice. After cooling, 5 mL of boron trifluoride-methanol was added to the samples, which were again heated to 100°C for 30 min and cooled for 5 min on ice. Then, 600  $\mu$ L of *n*-hexane with butylated hydroxytoluene (BHT) (0.02%) was added to prevent lipid oxidation. The tubes were vortexed, and 2 mL of sodium chloride was added; then, the tubes were centrifuged for 10 min at 2200 rpm. The top layer was retrieved and dried with anhydrous sodium sulfate. Then, 100  $\mu$ L was removed and evaporated to dryness with nitrogen and finally rediluted in 75  $\mu$ L of *n*-hexane [12].

Gas chromatography analyses were performed using a Shimadzu GC-2010 equipped with a flame ionization detector and a Shimadzu AOC-20i autoinjector. The separation of FAMES was carried out on an Agilent® J&W Cp-Sil 88 capillary column (50 m  $\times$  0.25 mm ID, 0.20  $\mu$ m) from Santa Clara, USA. The operating conditions were as follows: the split-splitless injector was used in split mode with a split ratio of 1:50. The injection volume of the sample was 1.5  $\mu$ L. The injector and detector temperatures were kept at 250°C and 270°C, respectively. The temperature program was as follows: initial temperature 120°C for 5 min, which was increased at 3°C/min to 220°C and held at this level for 10 min (total run time: 48 min); carrier gas: He, 30 mL/min; detector gas flows: H<sub>2</sub>, 40 mL/min; air, 400 mL/min. Data acquisition and processing were performed with Shimadzu software for GC systems.

**2.4. Statistical Analysis.** Statistical analyses were performed with the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS statistical software, version 21.0, IBM Corp., USA). The

TABLE 2: Plasma fatty acids.

Plasma FA	n	NOD		Diabetes (D)			Controls (C)			NOD versus D p	NOD versus C p	C versus D p
		Mean	SD	N	Mean	SD	n	Mean	SD			
Sat. FA	8	35,12	3,33	34	31,77	2,87	10	34,45	1,39	0,009	0,897	0,004
Omega-3	8	4,37	1,05	34	4,21	0,98	10	3,76	0,52	0,44	0,043	0,085
Omega-6	8	34,82	4,18	34	39,11	3,85	10	34,97	2,87	0,012	0,829	0,001
LA/ALA	7	220,45	86,35	28	184,82	101,94	9	498,84	285,05	0,199	0,042	0,002

NOD: new onset diabetes; Sat. FA: saturated fatty acids; SD: standard deviation; NPT: nonparametric test.

TABLE 3: Plasma fatty acid profile.

Plasma fatty acid profile	New onset diabetes			Diabetes			Controls			NPT		
	n	Mean	SD	N	Mean	SD	n	Mean	SD	Nod versus D p	Nod versus C p	C versus D p
Butyric acid	8	1,55	2,31	34	0,78	1,18	10	1,19	0,74	0,199	0,515	0,058
Caproic acid	6	0,03	0,02	29	0,07	0,04	9	0,03	0,01	<b>0.014</b>	0,955	<b>0.004</b>
Lauric acid	7	0,14	0,11	11	0,06	0,02	9	0,10	0,07	0,056	0,408	0,056
Myristic acid	8	1,05	0,55	34	0,67	0,30	10	0,83	0,25	<b>0.037</b>	0,408	0,096
Pentadecanoic acid	8	0,28	0,12	32	0,29	0,26	10	0,29	0,14	0,415	0,762	0,358
Palmitic acid	8	23,82	2,36	34	21,01	1,71	10	22,99	1,48	0,001	0,515	<b>0.002</b>
Palmitoleic acid	8	1,71	0,80	34	1,03	0,38	10	1,75	0,44	<b>0.022</b>	0,515	0,0004
Heptadecanoic acid	8	0,29	0,07	34	0,25	0,07	10	0,24	0,05	0,114	0,068	0,710
Stearic acid	8	7,86	0,98	34	8,47	1,56	10	8,62	0,71	0,210	0,083	0,945
Oleic acid	8	22,92	2,52	34	22,35	4,87	10	24,04	1,67	0,320	0,315	0,031
Linoleic acid	8	26,82	3,55	34	30,72	3,67	10	27,87	3,00	<b>0.012</b>	0,573	<b>0.041</b>
γ-Linolenic acid	8	0,54	0,20	34	0,50	0,12	10	0,64	0,32	0,937	0,515	0,066
ALA	7	0,14	0,08	28	0,20	0,09	9	0,08	0,06	0,104	<b>0.042</b>	<b>0.0002</b>
Arachidonic acid	8	7,23	1,45	34	7,70	1,69	10	6,22	0,85	0,304	0,101	<b>0.001</b>
DHA	8	2,12	0,75	34	1,95	0,74	10	1,35	0,33	0,582	<b>0.016</b>	<b>0.002</b>

ALA: α-linolenic acid; NPT: nonparametric test.

acquired data (clinical, biological, and fatty acids profiles) were divided into two different pairs: diabetic/not diabetic and inaugural diabetic/not inaugural diabetic. Clinical and biological data were reported as the mean and standard deviation (SD), as well as median and respective interquartile range (IQR), and the lipid profile data for these groups were reported as the median and respective interquartile range (IQR). The Mann-Whitney test was used to compare the median of the fatty acid percentage between the groups. All probabilities with *P* values < 0.05 were regarded as significant.

### 3. Results

**3.1. Plasmatic Fatty Acids Profile. Inaugural Diabetes versus Noninaugural Diabetes.** Significant differences between these two groups of children were observed. There was a significant difference in the presence of saturated fatty acids, long-chain saturated fatty acids, palmitic acid, and palmitoleic acid, with higher levels at the time of diagnosis. Moreover, we observed higher levels of omega-6 fatty acids in diabetic children (Table 2).

**Inaugural Diabetes versus Controls.** Children with a recent diagnosis of diabetes had higher levels of omega-3 fatty acids,

alpha-linolenic acid, and DHA. Healthy children from the control population had a higher ratio of LA/ALA (linoleic acid/alpha-linolenic acid).

**Noninaugural Diabetes versus Controls.** The EPA/AA ratio (eicosapentaenoic acid/arachidonic acid) and the amounts of saturated fatty acids, omega-9 fatty acids, *cis*-monounsaturated fatty acids, saturated long-chain fatty acids, palmitic acid, and palmitoleic acid were higher in the control population. The diabetic children had higher levels of omega-6 fatty acids, polyunsaturated fatty acids, *cis*-pentadecenoic acid, heptadecenoic acid, linoleic acid, linolenic acid, and arachidonic acid (Table 3).

### 4. Discussion

Contrary to findings from other studies, the levels of omega-3 fatty acids were higher in the recent diabetes group relative to controls. However, other studies have found no relationship between the presence of these fatty acids and diabetes [13]. The amount of omega-6 fatty acids was actually higher in the control population. The content of fatty acids in the control population, which was made up of healthy children with a normal BMI, raises questions about the diet of these children.

TABLE 4: Plasma lipid profile.

Plasma lipid profile	N	New onset diabetes				n	Diabetes				Nonparametric test NOD versus D
		Min.	Max.	Mean	SD		Min.	Max.	Mean	SD	
Total cholesterol (mg/dl)	5	175.0	215.0	187.0	17.13	31	123.0	224.0	162.26	22.34	0.012
Total triglycerides (mg/dl)	5	50.0	81.0	62.8	12.28	30	31.0	118.0	59.43	20.92	0.477
HDL cholesterol (mg/dl)	5	80.0	150.0	107.8	27.22	30	52.0	135.0	91.7	19.16	0.321
LDL cholesterol (mg/dl)	5	49.0	87.0	66.6	13.59	31	21.0	75.0	58.1	11.09	0.282

We found that omega-6 levels were higher in the non-recent diabetes group compared to the recent diabetes and to the control groups. In addition, linoleic acid levels were higher in the recent diabetes group. Kurotani et al. have already described an inverse relationship between the levels of C-peptide and this fatty acid [13].

An inhibitory effect of palmitic acid on the production and metabolic action of insulin has been described [14]. Curiously, our results showed higher levels of this fatty acid in the recent diabetes group.

Several studies have also shown a relationship between elevated levels of palmitic and palmitoleic acids and low levels of linolenic and linoleic acids with insulin resistance markers [15–17].

It is interesting to note that the omega-6/omega-3 ratio did not fall within the recommended values (3/1) in either group (inaugural diabetes: 7.9/1; noninaugural diabetes: 9.2/1; controls: 9.3/1) [18]. The polyunsaturated fatty acids were more abundant in children with established diabetes, even when compared to controls. There was an inverse relationship with respect to saturated fatty acids and long-chain fatty acids, which were lower in the children with diabetes. Although many different fatty acids have statistically significant relationships between these three groups, some seem to detach due to very low levels of alpha-linolenic acid in either the control or the inaugural diabetes group. Furthermore, curiously, EPA and DHA were more abundant in the children with diabetes compared with the control population and the inaugural diabetes group.

All of these differences were found in children with identical total triglycerides, though cholesterol levels were higher at the time diabetes was diagnosed. The overall lipid profile was not assessed in the controls (Table 4).

## 5. Conclusion

Our results showed that children with diabetes had higher levels of alpha-linolenic acid, EPA, and DHA, as well as mono- and polyunsaturated fatty acids. This observation is attributed to pharmacological therapy and nutritional management of these children. Indeed, knowing the crucial role of food in the treatment and control of type 1 diabetes is part of the follow-up of these patients, which is supposed to review and guide them from a nutritional point of view. Particular emphasis should be placed on the importance of maintaining a healthy diet, with an adequate component of fruits and vegetables as well as diversification of animal sources. Note that the fatty acid profile of diabetic children appears to be healthier than that of children in their inaugural

episode as well as healthy children, leading the authors to highlight the importance of early nutritional intervention.

It is also noted that “healthy” Portuguese children show high levels of saturated fatty acids, as well as an omega-6/omega-3 ratio that is much higher than recommended. Even though we live in a country where, ideally, a so-called Mediterranean diet is practiced, the authors question whether the younger members of our society are actually consuming this type of diet.

## Abbreviations

BMI:	Body mass index
NF-kB:	Nuclear factor-kB
INF-γ:	Interferon-γ
EPA:	Eicosapentaenoic acid
DHA:	Docosahexaenoic acid
BHT:	Butylated hydroxytoluene
LA/ALA:	Linoleic acid/alpha-linolenic acid
EPA/AA:	Eicosapentaenoic acid/arachidonic acid.

## Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- [1] J. M. Norris, M. Kroehl, T. E. Fingerlin et al., “Erythrocyte membrane docosapentaenoic acid levels are associated with islet autoimmunity: the Diabetes Autoimmunity Study in the Young,” *Diabetologia*, vol. 57, no. 2, pp. 295–304, 2014.
- [2] P. C. Calder and R. F. Grimble, “Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity,” *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 56, no. 3, pp. S14–S19, 2002.
- [3] K. Fritsche, “Fatty acids as modulators of the immune response,” *Annual Review of Nutrition*, vol. 26, pp. 45–73, 2006.
- [4] J. M. Norris, X. Yin, M. M. Lamb et al., “Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and islet autoimmunity in children at increased risk for type 1 diabetes,” *Journal of the American Medical Association*, vol. 298, no. 12, pp. 1420–1428, 2007.
- [5] E. M. Balk, A. H. Lichtenstein, M. Chung, B. Kupelnick, P. Chew, and J. Lau, “Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review,” *Atherosclerosis*, vol. 189, no. 1, pp. 19–30, 2006.
- [6] P. C. Calder, “Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale,” *Biochimie*, vol. 91, no. 6, pp. 791–795, 2009.
- [7] C. N. Serhan, “Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not?” *American Journal of Pathology*, vol. 177, no. 4, pp. 1576–1591, 2010.

- [8] S. G. Harris, J. Padilla, L. Koumas, D. Ray, and R. P. Phipps, "Prostaglandins as modulators of immunity," *Trends in Immunology*, vol. 23, no. 3, pp. 144–150, 2002.
- [9] P. Luo and M. H. Wang, "Beta-cell function and diabetes," *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, vol. 95, pp. 1–10, 2011.
- [10] Q. Hua, J. Liang, Chen, and Y. Wang, "Development of a derivatization-free GC-FID method for evaluation of free fatty acid levels in plasma of diabetic nephropathy patients," *Chemical Research in Chinese Universities*, vol. 27, no. 4, pp. 578–583, 2011.
- [11] T. Seppänen-Laakso, I. Laakso, and R. Hiltunen, "Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition," *Analytica Chimica Acta*, vol. 465, no. 1–2, pp. 39–62, 2002.
- [12] I. Bondia-Pons, C. Moltó-Puigmartí, A. I. Castellote, and M. C. López-Sabater, "Determination of conjugated linoleic acid in human plasma by fast gas chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1157, no. 1–2, pp. 422–429, 2007.
- [13] K. Kurotani, M. Sato, Y. Ejima et al., "High levels of stearic acid, palmitoleic acid, and dihomo- $\gamma$ -linolenic acid and low levels of linoleic acid in serum cholesterol ester are associated with high insulin resistance," *Nutrition Research*, vol. 32, no. 9, pp. 669–675, 2012.
- [14] P. Zahradka, J. Wigle, and G. N. Pierce, "High levels of palmitic acid lead to insulin resistance due to changes in the level of phosphorylation of the insulin receptor and insulin receptor-1," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 246, pp. 155–162, 2003.
- [15] L. Wang, T. Folsom, Z. Zheng, J. Pankow, and J. Eckfeldt, "Plasma fatty acid composition and incidence of diabetes in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study," *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 78, pp. 91–98, 2003.
- [16] J. Gustavo Vazquez-Jimenez, J. Chavez-Reyes, T. Romero-Garcia et al., "Palmitic acid but not palmitoleic acid induces insulin resistance in a human endothelial cell line by decreasing SERCA pump expression," *Cellular Signalling*, vol. 28, no. 1, pp. 53–59, 2016.
- [17] F. Bei, J. Jia, Y.-Q. Jia et al., "Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats," *Lipids in Health and Disease*, vol. 14, no. 1, article 96, 2015.
- [18] J. Á. D. L. Perini, F. B. Stevanato, S. C. Sargi et al., "Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: metabolism in mammals and immune response," *Revista de Nutricao*, vol. 23, no. 6, pp. 1075–1086, 2010.

### 3.2.1.2. Factores de Risco - Stresse Oxidativo

É conhecido que o primeiro passo no desencadear de fenómenos ateroscleróticos é a deposição lipídica na parede endotelial<sup>92</sup>.

Pequenas partículas LDL penetram a barreira endotelial e depositam-se na matriz extracelular do espaço sub-endotelial, pela ligação da Apolipoproteína B aos proteoglicanos<sup>220</sup>. O segundo passo da aterogénese é a oxidação subendotelial das partículas de LDL, pelas células vasculares, desencadeando a produção de Proteína Químioatraente Monocitária - 1 (*Monocyte Chemoattractant Protein-1* - MCP-1) e Factores Estimulantes Macrofágicos (*Macrophage Colony Stimulating Factors* - M-CSF)<sup>96</sup>.

Na presença de tabagismo, HTA, hiperglicemia e hiperlipidemia, a produção de Espécies Reativas de Oxigénio (*Reactive Oxygen Species* - ROS), aumenta e sobrepõe-se à capacidade de resposta antioxidante do organismo<sup>92</sup>. O stresse oxidativo aumenta a oxidação das partículas LDL, com progressivo aumento da formação de placas ateroscleróticas<sup>92</sup>.

A hiperglicemia, hiperlipidemia ou tabagismo contribuem para a formação de produtos avançados da glicação (*Advanced Glycation End products* - AGEs), que ativam citocinas e aumentam a retenção de LDL a nível endotelial e isto contribui também para a lesão aterosclerótica, acelerando a geração de ROS e induzindo inflamação<sup>92</sup>. As possíveis origens de stresse oxidativo na diabetes incluem a autooxidação da glicose, desvio no equilíbrio redox, diminuição da concentração tecidual de antioxidantes e menor actividade destes<sup>221</sup>.

Os mecanismos de defesa antioxidante englobam estratégias enzimáticas e não-enzimáticas. Os antioxidantes não enzimáticos conhecidos são as vitaminas A, C e E, glutatião, ácido alfa-lipoico, carotenoides, Coenzima Q10, vários flavonoides, alguns minerais (cobre, zinco, manganésio e selénio) e cofactores (ácido fólico, ácido úrico, albumina, vitaminas B1, B2, B6 e B12). Os antioxidantes enzimáticos são a dismutase do superóxido, catalase, glutatião peroxidase e reductase<sup>222</sup>.

Dado conhecer-se a importância desta relação e fino equilíbrio entre a presença de oxidantes e antioxidantes, de um modo geral, mas de forma ainda mais pertinente, na presença de patologias que facilmente aumentam a concentração de partículas oxidantes, foi objeto deste projeto a avaliação da presença de antioxidantes em crianças diabéticas.

## Can Antioxidative Status Be Involved in Type 1 Diabetes?

Cintia Castro-Correia<sup>a, b, f</sup>, M. Luz Maia<sup>c</sup>, Sonia Norberto<sup>c</sup>, Cristina Costa-Santos<sup>a, d</sup>,  
M. Fatima Barroso<sup>c</sup>, Ana Carvalho<sup>c</sup>, Manuel Fontoura<sup>b</sup>, Valentina Domingues<sup>c</sup>,  
Conceicao Calhau<sup>a, e</sup>

### Abstract

**Background:** Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune disease with beta-cell destruction, resulting in insulin deficiency. It is now clear that environmental factors also play a role in disease development. The prevalence of type 1 diabetes in children and young people in Portugal is 0.16% between 0 and 19 years of age. The main cause of death in T1DM is cardiovascular disease, and early endothelial dysfunction is its pathophysiological precursor. Hyperglycemia is associated with increased production of free radicals and increased oxidative stress. The aim of this study was to analyze the antioxidant status in a pediatric portuguese diabetic population.

**Methods:** The study was conducted to characterize and compare the antioxidant status in children aged 2 - 10 years old, with type 1 diabetes and healthy children. Plasmatic profile of total phenolic content (TPC), ferric reducing antioxidant power (FRAP), Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) in children with diabetes and controls, pre-pubescent, and with BMI < 85th centile were evaluated.

**Results:** FRAP values were significantly lower in diabetic children compared with healthy controls ( $P < 0.001$ ). There was not any statistical significant difference in the TPC and the TEAC determinations.

**Conclusions:** Young Portuguese diabetic children have a lower antioxidant status than healthy children.

**Keywords:** Antioxidant; Type 1 diabetes

### Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is an autoimmune disease with beta-cell destruction, resulting in insulin deficiency. The incidence of pediatric diabetes is increasing for T1DM [1]. A genetic predisposition seems to be necessary for developing the disease and is most often linked to genes in the HLA-complex [2]. Islet autoantibodies are detected in the majority of individuals at the time of diagnosis of T1DM, and these are directed against pancreatic proteins like insulin, glutamic acid decarboxylase (GAD), islet antigen 2 (IA-2), or zinc transporter 8 [3]. It is now clear that environmental factors also play a role in disease development [4].

Factors like maternal age at delivery, infections in early life, deficiency of specific nutrients during pregnancy, and/or early childhood have been associated with risk of T1DM [4]. Other suggested environmental risk factors for T1DM are alterations in gut microbiota and lack of general exposure to microbial factors [5].

The prevalence of T1DM in children and young people in Portugal is 0.16% between 0 and 19 years of age. In 2014, there were 17.5 new cases per 100,000 young people between the ages of 0 and 14 [6]. Portuguese people should be consuming a mediterranean diet, which is a traditional dietary pattern of the inhabitants of the Mediterranean countries, and considered to be one of the healthiest diets, rich in many nutrients, namely antioxidants [7, 8]. Despite of that, there are increasingly reports demonstrating a low adherence to this diet, and mainly between the youngest [9].

The main cause of death in T1DM is cardiovascular disease, and early endothelial dysfunction is its pathophysiological precursor, since very early [10]. Hyperglycemia is associated with increased production of free radicals and increased oxidative stress [11]. This is due to the increased production of reactive oxygen species (ROS) and decreased antioxidant state [12]. It was demonstrated that some non-nutrient compounds, such as the abundant plant phenolic substances, may contribute significantly to preventing oxidant damage [13].

Polyphenols show antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* and therefore might protect from oxidative stress-related diseases such as cardiovascular disease [14, 15].

Although other authors analyzed the antioxidant status in diabetic children, different results have been obtained, and to our knowledge, this is the first study to analyze a pediatric portuguese diabetic population.

This work will focus on the antioxidant status profile in

Manuscript submitted July 3, 2017, accepted July 24, 2017

<sup>a</sup>CINTESIS, Center for Research in Health Technologies and Information Systems, Porto, Portugal

<sup>b</sup>Unidade de Endocrinologia Pediatria, Servico Pediatria, Hospital de S. Joao, Porto, Portugal

<sup>c</sup>Requimte/LAQV-GRAQ, Instituto Superior de Engenharia, Instituto Politecnico do Porto, P-4200-072 Porto, Portugal

<sup>d</sup>MEDCIDS, Departamento Medicina da Comunidade, Informacao e Decisao em Saude, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>e</sup>Nutrition & Metabolism, NOVA Medical School, FCM Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal

<sup>f</sup>Corresponding Author: Cintia Castro-Correia, CINTESIS, Center for Research in Health Technologies and Information Systems, Porto, Portugal. Email: cintiacastro-correia@hotmail.com

doi: <https://doi.org/10.14740/jocmr31200>

Articles © The authors | Journal compilation © J Clin Med Res and Elmer Press Inc™ | [www.jocmr.org](http://www.jocmr.org)

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial 4.0 International License, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited



pre-pubertal children, aiming to a possible impact of antioxidant on T1DM evolution and onset of complications. The authors analyzed the antioxidant status in children with established diabetes (> 6 months after diagnosis) and compared with healthy controls of the same age. In order to analyze the antioxidant status, different assays were used, namely ferric reducing antioxidant power (FRAP) and Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), both of which use organic radical producers. These methods determine the delay of radical generation and the ability to scavenge the radicals [16]. Total phenolic content (TPC) evaluates the phenolic compounds, that are metabolites with significant antioxidant potential [17].

## Materials and Methods

### Participants

Type 1 diabetic patients attending the Pediatric Endocrinology Clinic in Hospital de S. Joao, Porto, were selected for the study. The study group consisted of 23 diabetic children, with diagnosis for more than 6 months (12 males and 11 females) with a median age of 7.15 years. Exclusion criteria were BMI > 85th centile, the presence of puberty, complications such as retinopathy, nephropathy or neuropathy, other diseases or medications. Healthy aged matched individuals (N = 12) served as controls. All the diabetic children were treated with glargine and rapid analogues (lispro, aspart or glulisin) according to a multiple daily injections system.

The project was approved by the Institutional Ethics Committee and all the patients parents/tutors signed an informed consent prior to commencement of the study.

### Reagents and materials

#### Sample preparation

The blood was collected in tubes with EDTA. Samples were centrifuged at 2,000 g, 15 min at room temperature. Plasma was separated and stored at 20 °C until analysis.

#### Chemicals

Gallic acid, ascorbic acid, and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, a water-soluble analogue of vitamin E) standards were from Sigma-Aldrich or Fluka. Folin-Ciocalteu reagent, sodium fluorescein, 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) and FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O were from Sigma-Aldrich and 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) was from Fluka. All remaining reagents of analytical grade were obtained from Merck. Standard antioxidant solutions were daily prepared and stored in the dark at 4 °C when not in use. Solutions were prepared with ultra-pure water (Millipore, Simplicity 185). All the spectrophotometric assays were performed in a Synergy HT W/TRF Multi Mode Microplate

Reader with Gen5 2.0 software (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA).

#### TPC

TPC values of plasma samples were determined by a colorimetric assay based on procedures described by Singleton and Rossi [18]. TPC was expressed as gallic acid equivalents (GAE; mg gallic acid/100 g of sample) through the calibration curves of gallic acid. Final results were in µg of GAE mL<sup>-1</sup>. Calibration curve ranged from 10 to 200 µg of GAE mL<sup>-1</sup>.

#### FRAP

FRAP values of plasma samples were determined by a colorimetric assay based on the method described by Benzie and Strain [19]. FRAP was expressed as ascorbic acid equivalents (AAEs; mg ascorbic acid/100 g of sample) through the calibration curve of ascorbic acid. Final results were in µg of AAE mL<sup>-1</sup>. Calibration curve ranged from 5 to 100 µg of AAE mL<sup>-1</sup>.

#### TEAC

TEAC assay assesses the total radical scavenging capacity based on the ability of a compound to scavenge the stable ABTS•<sup>+</sup> radical in 6 min. TEAC values of plasma samples were determined by a colorimetric assay based on the method described by Re et al [20]. The total antioxidant capacity was expressed as percentage of inhibition (PI), according to the equation: where AbsABTS•<sup>+</sup> corresponds to the initial absorbance of diluted ABTS•<sup>+</sup> and Abssample corresponds to the absorbance of the sample after 6 min of reaction. TEAC values were expressed as Trolox equivalents (TEs; mg Trolox/100g of sample) using the standard curve of Trolox. Final results were in µg of TE mL<sup>-1</sup>. Calibration curve ranged from 5 to 100 µg of TE mL<sup>-1</sup>.

Calibration standards were daily prepared, and all samples were determined in triplicate. For all the analysis, we have  $r \geq 0.99$ .

HbA1c was determined with DCA 2000+ Analyzer (Bayer Inc., Tarrytown, NY, USA) immunoassay system (normal range: 3-6%).

### Statistical analysis

Age comparison between diabetic children and controls groups was done with independent sample *t*-test and gender comparison between diabetic children and controls groups was done with Chi-square test.

Median values of TPC, FRAP and TEAC concentrations were reported because of the skewed distribution of data.

TPC, FRAP and TEAC values comparisons between



**Table 1.** Comparison of Mean Age and % of Female Gender in Diabetic Children (T1DM) and Controls

	T1DM (n = 23)	Controls (n = 12)	P
Age*, mean (SD)	7.5 (2.7)	6.6 (2.2)	0.349
Female gender, n (%)	11 (48)	5 (42)	0.728

\*Age is missing in two cases from control group. SD: standard deviation.

diabetic children and controls groups were done with Mann-Whitney tests.

A linear regression was performed with logarithm of the logarithm of FRAP values as dependent variable and childrens age and group (diabetic children and controls) as independent variables.

A significance level of 5% was used in all the analyses.

## Results

Significant differences in age and gender among diabetic children (T1DM) and controls were not found (Table 1).

The mean duration of disease was 3.29 years in diabetic children. The mean HbA1c was 8.17% in diabetic children.

As obesity was considered an exclusion factor, due to possible interference with metabolic oxidative systems quantification, both groups had a homogeneous BMI.

HbA1c in the diabetic group was higher than recommended by endocrine societies in general.

TPC, FRAP and TEAC values comparison between diabetic children and controls were presented in Table 2.

FRAP values were significantly lower in diabetic children compared with healthy controls ( $P < 0.001$ ). There was not any significant difference in the TPC and the TEAC determinations between the groups.

Linear regression showed that the group of diabetic children had less log FRAP concentration than the controls ( $\beta = -0.349$ ,  $P < 0.001$ ) even adjusted for age ( $\beta = -0.007$ ,  $P = 0.616$ ).

## Discussion

Oxidative stress is determined by a balance between ROS generation and antioxidant defense mechanisms that eliminate the superoxide radicals and similar compounds [21]. The antioxidant defense system consists of a series of specific enzymes, binding proteins and various low molecular weight antioxidants such as ascorbic acid, cysteine, glutathione and urate

[21]. Some elements of this system are measured in the blood as markers [21]. Diabetes is considered a state of increased oxidative stress, but the data published to date are contradictory [22, 23].

Hyperglycemia generates free radicals through several biochemical pathways (nonenzymatic glycation, the polyol pathway and glucose oxidation) [24]. Free radicals can result in consumption of antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation [24].

In this study, markers of antioxidant defense in pediatric patients with T1DM were evaluated.

The study included a homogeneous group of patients with T1DM, and compared results with healthy controls. The results obtained in this study showed that healthy children had significantly higher antioxidant defense activity reflected by FRAP. This occurred despite of the fact that diabetic children are stimulated to follow a particularly healthy diet, with a higher consumption of fruit and vegetables.

Varvaroksa et al demonstrated a lower level of antioxidant capacity among diabetic children, but with the same tendency exhibited by their healthy siblings [25]. In our study, there was a clear tendency for a lower antioxidant level in diabetic children, in relation to the control group.

Other authors showed that in young diabetic patients, systemic oxidative stress is present upon early onset of T1DM [26]. The fact of the diabetic children having a lower antioxidant status and considering their young age (all the children were pre-pubertal) leads to the need of a very careful follow-up, not only of cardiovascular risk, but also other pathological situations related to a higher oxidant level.

## Conclusions

Young Portuguese diabetic children have a lower antioxidant status than healthy children. Therefore, a very careful follow-up is necessary and it is of particular importance promoting healthy habits that enhance the antioxidative defenses of the diabetic children since the very early years.

## References

1. Dabelea D, Mayer-Davis EJ, Saydah S, Imperatore G, Linder B, Divers J, Bell R, et al. Prevalence of type 1 and type 2 diabetes among children and adolescents from 2001 to 2009. JAMA. 2014;311(17):1778-1786.
2. Beck JK, Cogen FR. Outpatient Management of Pediatric Type 1 Diabetes. J Pediatr Pharmacol Ther. 2015;20(5):344-357.

**Table 2.** TPC, FRAP and TEAC Values Comparison Between Diabetic Children (T1DM) and Controls

	T1DM, median (min-max)	Controls, median (min-max)	P
Concentration TPC	1,814 (1,555 - 2,119)	1,804 (1,677 - 2,156)	0.862
Concentration FRAP	39.3 (30.3 - 48.3)	52.1 (35.9 - 111.8)	< 0.001
Concentration TEAC	838 (685 - 1,113)	885 (816 - 1,138)	0.058

min: minimum; max: maximum.

3. Alves C, Santos LS, Toralles MB. Association of type 1 diabetes mellitus and autoimmune disorders in Brazilian children and adolescents. *Indian J Endocrinol Metab.* 2016;20(3):381-386.
4. Balazard F, Le Fur S, Valtat S, Valleron AJ, Bougneres P, Isis-Diab collaborative g, Thevenieau D, et al. Association of environmental markers with childhood type 1 diabetes mellitus revealed by a long questionnaire on early life exposures and lifestyle in a case-control study. *BMC Public Health.* 2016;16(1):1021.
5. Vaarala O. Gut microbiota and type 1 diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2012;9(4):251-259.
6. Annual report of the national diabetes observatory - 2015 edition.
7. Serra-Majem L, Ferro-Luzzi A, Bellizzi M, Salleras L. Nutrition policies in Mediterranean Europe. *Nutr Rev.* 1997;55(1 Pt 2):S42-57.
8. Potentas E, Witkowska AM, Zujko ME. Mediterranean diet for breast cancer prevention and treatment in postmenopausal women. *Prz Menopauzalny.* 2015;14(4):247-253.
9. Rodrigues D, Muc M, Rodrigues PR, Pinto AM, Padez C. Dietary patterns and their socioeconomic and behavioral determinants in 6- to 8-year-old portuguese children. *Ecol Food Nutr.* 2016;55(5):428-441.
10. Hoffman RP. Vascular endothelial dysfunction and nutritional compounds in early type 1 diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2014;10(3):201-207.
11. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism.* 1995;44(3):363-368.
12. Gokkusu C, Palanduz S, Ademoglu E, Tamer S. Oxidant and antioxidant systems in niddm patients: influence of vitamin E supplementation. *Endocr Res.* 2001;27(3):377-386.
13. Kerry N, Rice-Evans C. Inhibition of peroxynitrite-mediated oxidation of dopamine by flavonoid and phenolic antioxidants and their structural relationships. *J Neurochem.* 1999;73(1):247-253.
14. Hollman PCH. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *J Sci Food Agr.* 2001;81:842-852.
15. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(4):418-425.
16. Schlesier K, Harwat M, Bohm V, Bitsch R. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. *Free Radic Res.* 2002;36(2):177-187.
17. Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* 1997;416(2):123-129.
18. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965;16:144L-P-158.
19. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-76.
20. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(9-10):1231-1237.
21. Gawlik K, Naskalski JW, Fedak D, Pawlica-Gosiewska D, Grudzien U, Dumnicka P, Malecki MT, et al. Markers of antioxidant defense in patients with type 2 diabetes. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:2352361.
22. Colak E, Dimitrijevic-Sreckovic V, Djordjevic PB, et al. Biomarkers of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense in type 2 diabetes mellitus - comparative analysis. *Biochemia Medica.* 2008;18(1):42-51.
23. Moussa SA. Oxidative stress in diabetes mellitus. *Romanian Journal of Biophysics.* 2008;18(3):225-236.
24. Valabhji J, McColl AJ, Richmond W, Schachter M, Rubens MB, Elkeles RS. Total antioxidant status and coronary artery calcification in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 2001;24(9):1608-1613.
25. Varvarovska J, Racek J, Stozicky F, Soucek J, Trefil L, Pomahacova R. Parameters of oxidative stress in children with Type 1 diabetes mellitus and their relatives. *J Diabetes Complications.* 2003;17(1):7-10.
26. Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care.* 1998;21(10):1736-1742.

### 3.2.2. Manifestações Sub-clínicas

Achados vasculares anormais associados a aterosclerose são observados mais precocemente na DMT1. Em idade pediátrica é fundamental pensar sobretudo nas manifestações sub-clínicas da doença macrovascular, pois são estas que se vão forjando em criança, e que condicionam uma pior qualidade de vida no adulto, assim como um risco elevado de mortalidade precoce.

Uma das alterações descritas em adultos (com idades compreendidas entre os 20 e os 55 anos) é a calcificação das artérias coronárias, sendo esta preditiva de acidente cardiovascular<sup>223</sup>. É conhecido que estas alterações se associam a maior risco de demência, isquemia dos membros inferiores e eventual necessidade de amputação e insuficiência renal<sup>224</sup>. No entanto, os estudos desta manifestação em idade pediátrica são muito poucos e não relacionados com a DMT1, o que provavelmente traduz a dificuldade na avaliação sistemática deste fenómeno nas crianças.

Quanto à doença carotídea sub-clínica, envolve o aumento da espessura da íntima-média (IMT) e placa carotídea<sup>79</sup>. O aumento da IMT carotídea relaciona-se com a idade, IMC, duração da diabetes, colesterol total e LDL, tensão arterial, tabagismo e taxa de excreção de albumina<sup>79</sup>. Embora exista esta noção, continua a haver uma elevada incongruência de achados em diferentes trabalhos. Uma das formas mais fisiológicas de se pesquisar a presença de formas precoces de aterosclerose é a avaliação da rigidez arterial. Existem diversas formas de o fazer, entre as quais a determinação da VOP, o Índice de Rigidez Arterial Ambulatório (através da monitorização da TA em ambulatório em 24 horas) e a pesquisa da disfunção endotelial (através da avaliação da resposta a mecanismos de vasodilatação).

Em 2003, um dos primeiros trabalhos a estudar esta questão avaliou 31 jovens diabéticos, entre os 12 e os 17 anos, comparando-os com um grupo controlo. Avaliou a IMT carotídea e a resposta da artéria braquial à hiperemia (vasodilatação dependente do endotélio), seguida da resposta a nitroglicerina sub-lingual (vasodilatação independente do endotélio). Verificaram que havia uma disfunção endotelial nas crianças diabéticas, ainda com menos de 10 anos de duração da doença e que precedia o aumento do IMT<sup>226</sup>.

Haller e colaboradores, em 2007, estudaram 44 crianças diabéticas (idades: 14,6 +/-2,7 anos) e HbA1c – 8,34 +/-1,2%, comparando-as com 20 controlos e avaliando a tonometria da artéria radial reativa a hiperemia, constatando que esta seria uma técnica promissora na pesquisa de disfunção endotelial precoce<sup>83</sup>.

No entanto, ambas as metodologias descritas anteriormente implicavam alguma invasividade e não eram métodos facilmente aplicáveis na clínica.

O estudo SEARCH foi bastante abrangente e examinou 535 jovens diabéticos, comparando com 241 controlos saudáveis. Foi determinada a distensibilidade da artéria braquial, a velocidade da onda de pulso e índice de aumento corrigido para frequência cardíaca de 75 (AI75). Verificaram que a DMT1 condicionava maior IMC, LDL e TA, e que os diabéticos tinham menor distensibilidade da artéria braquial, e maior VOP, logo maior rigidez arterial<sup>84</sup>.

A rigidez arterial é o resultado da interação complexa de vários fatores (colagénio, elastina, metaloproteinases, entre outros) e influências endoluminais, associadas a sinalização neuroendócrina, conteúdo de sódio ou glicemia. É também uma consequência natural do envelhecimento, mas há várias doenças que se sabe contribuir para este processo, como a HTA, obesidade, doença renal crónica ou diabetes<sup>226</sup>.

A avaliação da VOP é uma forma dinâmica de pesquisar a distensibilidade vascular, e associa-se a manifestação precoce de aterosclerose. A VOP é definida como a velocidade com que se propagam as ondas de pressão geradas pela contração cardíaca sistólica, ao longo da árvore arterial<sup>227</sup>. Quanto mais elevada a VOP, menor distensibilidade e compliance apresentam os vasos, ou seja, mais rígidos são<sup>227</sup>. Vasos mais rígidos resultam num tempo de condução mais rápido, logo, num valor mais elevado de VOP.

O IMT é assim uma forma mais anatómica de pesquisar a presença sub-clínica de aterosclerose, sendo a VOP uma determinação mais funcional da mesma doença. Na verdade, a rigidez arterial é uma das primeiras modificações constatadas a nível vascular, e, por esse motivo, é utilizada para estratificação de risco a nível populacional<sup>227</sup>.

Em 2006, a Sociedade Europeia de Cardiologia emitiu um documento de consenso referindo que a medição da VOP seria o método mais simples, não invasivo, robusto e reproduzível para determinação da rigidez arterial<sup>228</sup>. A mesma Sociedade recomendou em 2013 a determinação da VOP como *gold standard* para avaliação de lesão arterial, adaptação vascular e eficácia terapêutica<sup>229</sup>.

A determinação da VOP considerada mais fidedigna é a carotídeo-femural, sendo utilizada como preditiva de eventos cardiovasculares, assim como no seguimento de adultos hipertensos, diabéticos, com insuficiência renal crónica ou coronariopatia<sup>228</sup>.

A rigidez arterial condiciona outros eventos, só por si também lesivos. Assim, a menor distensibilidade associa-se a uma menor capacidade de compliance com a elevação da tensão arterial<sup>230</sup>. A própria sensibilidade dos baroreceptores fica alterada, o que provoca alterações importantes na tensão arterial, mesmo durante atividade comuns da vida diária, como mudança postural ou exercício físico<sup>231</sup>.

A rigidez arterial representa uma sobrecarga ventricular esquerda, condicionando remodelação ventricular e menor eficácia mecânica, com maior necessidade de oxigenação miocárdica. Isso, associado à presença de aterosclerose, determina um risco ainda mais elevado de eventos cardiovasculares adversos<sup>82</sup>.

Existe a noção que a rigidez arterial aumenta com a idade, e, portanto, é fundamental efetuar esta avaliação de acordo com o grupo etário. Um dos primeiros trabalhos a propor níveis de referência para a população adulta foi publicado em 2010<sup>232</sup>. No mesmo ano, foram publicados valores de referência para a idade pediátrica, tendo em consideração não só a idade, mas também a sua estatura, sendo apresentados percentis para crianças pré-púberes e adolescentes<sup>233</sup>.

Em 2013, a publicação do estudo SEARCH com a avaliação longitudinal de 298 jovens diabéticos, confirmou um aumento da VOP nestes indivíduos, assim como a sua progressão ao longo do tempo, e associação a outros factores de risco, como a adiposidade central ou a dislipidemia, assim como um pior controlo glicémico<sup>234</sup>. Os sistemas de infusão contínua de insulina associam-se a um perfil glicémico mais estável e a uma melhoria no controlo metabólico, com diminuição da HbA1c<sup>235</sup>.

Tendo em consideração a modificação de atitudes terapêuticas dos últimos anos, deu-se início a um estudo prospectivo, em que se realizará a avaliação da VOP a crianças e adolescentes antes da colocação de Sistemas de Infusão Contínua de insulina e 1 ano e 2 anos depois do mesmo.

Entretanto, deu-se início à avaliação dos resultados obtidos numa pequena amostra de crianças e jovens diabéticos.

## Arterial Stiffness in children and adolescents with and without continuous insulin infusion

Enviado para publicação: Revista Portuguesa de Cardiologia

Castro-Correia<sup>1</sup>, C Moura<sup>2</sup>, C Mota<sup>2</sup>, R Santos-Silva<sup>1</sup>, JC Areias<sup>2</sup>, C Calhau<sup>3</sup>, M Fontoura<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Serviço de Pediatria, Hospital Pediátrico Integrado S João; Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal; <sup>2</sup>Serviço de Cardiologia Pediátrica, Hospital Pediátrico Integrado S João; Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, Portugal; <sup>3</sup>CINTESIS, Center for Research in Health Technologies and Information Systems, Porto, Portugal; Nutrition and Metabolism, NOVA Medical School, FCM Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal

C Castro-Correia: cintiacastro-correia@hotmail.com; C Moura: claudiammoura@yahoo.com; C Mota: claudia.mota.cmm@gmail.com; R Santos-Silva: ritasantosilva@gmail.com; JC Areias: jcareias@med.up.pt; C Calhau: ccalhau@nms.unl.pt; M Fontoura: manfontoura@gmail.com

Word count: 2135

Corresponding author and person to whom reprint requests should be addressed: Castro-Correia C, MD

Email: Cintiacastro-correia@hotmail.com

Alameda Hernâni Monteiro, Hospital S João, Serviço de Pediatria - 4200 Porto, Portugal

Abbreviations: CIIS: Continuous Insulin Infusion System; MDI: Multiple Daily Insulin Administrations; PWV: Pulse Wave Velocity; T1DM: Type 1 Diabetes Mellitus.

Key words: Pulse Wave Velocity; Arterial stiffness, Type 1 diabetes

Palavras-chave: Velocidade Onda Pulso, Rigidez arterial, Diabetes tipo 1

### Abstract

**Introduction:** Arterial stiffness is a consequence of aging, but there are several diseases that contribute to this process. The evaluation of PWV (Pulse Wave Velocity) allows a dynamic evaluation of vascular distensibility, and the detection of atherosclerosis at an early stage. It was intended to evaluate PWV in children and adolescents with T1 Diabetes Mellitus (T1DM) and to compare their outcome according to the type of treatment used.

**Materials and methods:** 48 patients were randomly selected. Inclusion criteria: T1DM, under intensive insulin therapy (Multiple Daily Insulin Administrations (MDI) or Continuous Insulin Infusion System (CIIS)). Exclusion criteria: existence of another chronic pathology or microvascular complications. Echocardiography was performed and three measurements of PWV were done, with their mean calculated.

**Results:** Most of the children and adolescents presented a PWV  $\geq$  to the 75th centile. There was a statistically significant difference for HbA1c (7.8 in CIIS vs 9 in MDI,  $p < 0.05$ ). There were not statistically significant differences in the PWV between the two groups. This can be attributed to the fact that children with CIIS are those who previously presented greater glycemic instability. There was a significant correlation between PWV and disease duration ( $r = 0.314$  -  $p = 0.036$ );  $r$  = Pearson's correlation coefficient.

**Conclusions:** This study showed that in children and adolescents with T1DM there is an important prevalence of arterial stiffness, translated by an increase in PWV. This increase in PWV appears to exist even in very young children with little disease evolution time.

## Resumo

**Introdução:** A rigidez arterial é uma consequência natural do envelhecimento, mas existem várias doenças que contribuem para esse processo. A avaliação da VOP (Velocidade de Onda de Pulso) permite uma avaliação dinâmica da distensibilidade vascular e a detecção da aterosclerose em estágio inicial. Pretendeu-se avaliar a VOP em crianças e adolescentes com Diabetes Mellitus tipo 1 (DMT1) e comparar os resultados de acordo com o tipo de tratamento utilizado.

**Materiais e métodos:** 48 pacientes foram selecionados aleatoriamente. Critérios de inclusão: DMT1 sob terapia intensiva com insulina (Múltiplas Administrações Diárias de Insulina (MADI) ou Sistema de Infusão Contínua de Insulina (SICI)). Critérios de exclusão: presença de outra patologia ou complicações microvasculares. Foi efectuado ecocardiograma e três medidas de VOP sendo a sua média calculada.

**Resultados:** A maioria das crianças e adolescentes apresentou uma  $VOP > / =$  ao Pc 75. Houve uma diferença estatisticamente significativa para HbA1c (7,8 em SICI vs 9 em MADI,  $p < 0,05$ ). Não houve diferenças estatisticamente significativas na VOP entre os dois grupos. Isso pode ser atribuído ao facto de que as crianças com SICI são aquelas que anteriormente apresentavam maior instabilidade glicémica. Houve uma correlação significativa entre VOP e duração da doença ( $r = 0,314$  -  $p = 0,036$ ); R = coeficiente de correlação de Pearson.

**Conclusões:** Este estudo mostrou que, em crianças e adolescentes com DMT1, há uma prevalência importante de rigidez arterial, traduzida por um aumento da VOP. Este aumento parece existir mesmo em crianças muito pequenas com pouco tempo de evolução da doença.

## Introduction

Arterial stiffness is the result of the complex interaction of various factors (collagen, elastin, metalloproteinases, among others) and endoluminal influences associated with neuroendocrine signaling, sodium content or glycemia. It is also a natural consequence of aging, but there are several diseases that contribute to this process, such as hypertension, obesity, chronic kidney disease or diabetes.<sup>1</sup> The evaluation of PWV (Pulse Wave Velocity) allows a dynamic evaluation of vascular distensibility, and the detection of atherosclerosis at an early stage. PWV is defined as the velocity with which the pressure waves generated by systolic contraction are propagated along the arterial tree.<sup>2</sup>

The higher the PWV, the less distensibility and compliance the vessels present.<sup>2</sup> Arterial stiffness is one of the first changes observed at the vascular level, and, therefore, is used for population-level risk stratification.<sup>2</sup> In 2006, the European Society of Cardiology issued a consensus document stating that measuring PWV would be the simplest, non-invasive, robust and reproducible method for determining arterial stiffness.<sup>3</sup> The same Society recommended in 2013 the determination of PWV as gold standard for evaluation of arterial lesion, vascular adaptation and therapeutic efficacy.<sup>4</sup> The most reliable PWV is carotid-femoral, which is used as predictive of cardiovascular events.<sup>3</sup> There is a notion that arterial stiffness increases with age, and therefore it is critical to perform this assessment according to the age group. In 2010, reference values for the pediatric age were published, taking into account not only age but also height, and percentiles were presented for prepubescent and adolescent children.<sup>5</sup>

In 2013, the SEARCH study longitudinally assessed 298 diabetic youngsters and showed that this population had an increase in PWV. It was also demonstrated that this increase was progressive over time and associated with other risk factors such as central adiposity or dyslipidemia, as well as worse glycemic control.<sup>6</sup>

Continuous insulin infusion systems are associated with a more stable glycemic profile and an improvement in metabolic control, with a decrease in HbA1c.<sup>7</sup> Taking into consideration the modification of therapeutic attitudes of the last years regarding Type 1 Diabetes Mellitus (T1DM), a study was started, in which it was intended to evaluate PWV in children and adolescents with Continuous Infusion Systems and under multiple administrations of insulin. It was intended to evaluate PWV in children and adolescents with T1DM and to compare their outcome with some factors, namely the type of treatment used.

## Methods

Of the 302 patients with T1DM followed at a pediatric diabetes reference center in Northern Portugal, 48 patients were randomly selected. The inclusion criteria were to have T1DM for more than 6 months and to be under intensive insulin therapy, either in the form of Multiple Daily Insulin Administrations (MDI) or under Continuous Insulin Infusion System (CIIS). The exclusion criteria were the existence of another chronic pathology, known microvascular complications or the use of other therapy in addition to insulin therapy. Age, duration of disease, height, HbA1c (%), and T2 - mode B - mode echocardiography were evaluated and three measurements of PWV were performed and their mean was calculated. Cardiac evaluation was performed by the same technician. The stature was evaluated with a rigid stadiometer, with an accuracy of 0.1 cm in orthostatism. HbA1c was determined by the immunoagglutination inhibition method, using the DCA 2000 apparatus, by capillary puncture.

### Echocardiographic Evaluation

Patients underwent a standard transthoracic echocardiographic evaluation in two-dimensional mode, M-mode, pulsed Doppler and color-coded Doppler. In addition, a tissue Doppler evaluation (TDI) of the mitral annulus was performed, as well as an evaluation of myocardial strain and strain rate. All measurements were taken simultaneously with electrocardiographic monitoring at a sweep speed of 100 mm/sec and recorded in the software for further analysis (EchoPAC system, GE). For each parameter, three measurements and their mean were taken. Pulse wave velocity (PWV) was evaluated by aplanation tonometry (Pulse Trace PWV, Micro Medical, UK), with additional electrocardiographic recording of three peripheral leads, always by the same operator. PWV is quantified by sequential acquisition of pressure waves at the level of the carotid and femoral arteries, where the distance



measured between the two points is divided by the delay period between the proximal and distal pressure wave, according to the R wave belonging to the QRS complex of the electrocardiographic record calculated by the software. Three consecutive measurements were performed, and the respective mean was calculated, which was the value used for the analysis. The classification of arterial stiffness, through PWV, was based on the article Reference Values of Pulse Wave Velocity in Healthy.<sup>5</sup>

## Results

Our sample is characterized by a group of 48 individuals with a median age of 12.8 years and a disease duration of 6.8 years. About 42% are under CIIS, with an average time of use of 2 years (Table 1). In this sample, we found that most of them presented a PWV  $\geq$  to the 75th centile either in an evaluation only taking into account their age group or related to their height.

**Table 1:** Characterization of the sample.

Age (average; min;Max) - years	12,8 (7; 19,6)
Sex (F/M)	24/24
Disease duration (average; min; Max) years	6,8 (3,7; 15,9)
MDI/CI (n)	28/20
Time of CIIS utilization (average; min; Max) years	1,92 (0; 5,5)

**Table 2:** Age, number of years of illness, time of use of CIIS and HbA1c, according to MDI versus CIIS.

	Age - years (median; min, max)	Number years illness (median; min, max)	HbA1c - % (median; min, max)
T1DM – CIIS (n=20)	12,3 (7,2-17,1)	6,6 (3,7-12,3)	7,8 (7,3-9,3)
T1DM – MDI (n=24)	13,7 (8,8-19,6)	6,7 (3,9-15,9)	9,0 (6,8-10,9)

The groups were compared with respect to these variables, using non-parametric tests for independent samples. There is a statistically significant difference for HbA1c (7.8 in CIIS vs 9 in MDI,  $p < 0.05$ ; Mann Whitney U test). For the current age and duration of the disease there are no statistically significant differences.

**Table 3:** Evaluation of relationship between therapeutic regimen used and determination of PWV adjusted for age and height.

	N	Average PWV	Standard Deviation PWV	P
				0,413
MDI	28	5,7	0,69	
CIIS	20	5,6	0,58	

There were no significant differences in the % of use of MDI versus use of CIIS, either with respect to the PWV percentile adjusted for stature ( $p < 0.785$  - chi-square) or percentile adjusted for age ( $p < 0.521$  - chi-square). There was no significant correlation between PWV and HbA1c ( $r = 0.143$  -  $p = 0.332$ ). There was a significant correlation between PWV and disease duration ( $r = 0.314$  -  $p = 0.036$ );  $r$  = Pearson's correlation coefficient. Thus, the higher the percentile of PWV adjusted for height or age, the longer the duration of the disease.

**Table 4:** Relationship between percentile of PWV adjusted for height and duration of T1DM.

PWV centile adjusted to height	N	Average duration T1DM	Standard Deviation
< 75	15	5,7	2,64977
75-90	13	6,8	2,48806
> 90	10	6,8	2,21937

**Table 5:** Relation between age-adjusted PWC percentile and duration of DMT1.

PWV centile adjusted according to age	N	Average duration T1DM	Standard Deviation
< 75	8	5,9	3,14369
75-90	16	6,3	2,45472
> 90	17	6,6	2,34086

## Discussion

Although the mean age is 12.8 years, this sample includes a group of prepubescent and adolescent children. On the other hand, the time of use of CIIS has a very large variability, which can condition the results. Thus, it was found that even in very young diabetic children, the presence of arterial stiffness is very high. It is worth noting that in this sample of 48 children, only 4 had PWV <Pc75 values. On the other hand, no relationship was found with HbA1c. One of the hypotheses to explain this finding is that although the determination of this value continues to have therapeutic implications, there is now a notion of the importance not only of the mean that is reflected by glycated hemoglobin, but also of glycemic instability. This means that diabetics with Hba1c values according to the current recommendations may present high glycemic variability, conditioning an early onset of complications.<sup>8</sup>

In 2017, in Portugal, the use of reimbursed CIIS became available for all children with T1DM under 10 years of age. However, until that date, this system was reimbursed for children under 5 years of age, and for those with a set of characteristics that determined the need to use CIIS for its metabolic control. One of these characteristics was that of presenting glycemic instability. This may explain the fact that no relationship was found with the type of therapy performed. That is, it is likely that older children have been started on CIIS in order to decrease their glycemic instability, and that may have determined an increase in arterial stiffness. What was actually observed was the relationship between the duration of the disease and the lower vascular distensibility. Taking into account the most recent data showing an increase in the incidence of T1DM in younger ages, it is essential to ensure, at pediatric age, HbA1c values within the targets recommended by the pediatric diabetology societies worldwide, maintaining the highest glycemic stability possible. It is important to carry out broad population studies to assess the impact of the new therapeutic approaches to this disease. It should be noted that, in a group of pre-pubertal and young children on CIIS, with an average of 5 years of illness, and despite a reasonable average HbA1c, important markers of endothelial dysfunction are found.

## Conclusions

This study showed that in children and adolescents with T1DM there is an important prevalence of arterial stiffness, translated by an increase in PWV, which is a well-known subclinical manifestation of atherosclerosis. This increase in PWV appears to exist even in very young children with little disease evolution time. On the other hand, the therapeutic regimen adopted (MDI vs CIIS) and the metabolic control (HbA1c) do not explain its interindividual variability. It is therefore crucial to find out, which factors may play a role in this atherosclerotic process and, on the other hand, how new technologies can help reverse this process.

## References

1. Savant JD, Furth SL, Meyers EC. *Arterial Stiffness in Children: Pediatric Measurement and Considerations*. Pulse (Basel). 2014 May; 2(1-4): 69–80.
2. Pereira T, Correia C, Cardoso J; *Novel Methods for Pulse Wave Velocity Measurement*; J Med Biol Eng. 2015; 35(5): 555–565.
3. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. *Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications*. Eur Heart J. 2006;27:2588–2605.
4. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al 2013. *ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC)*. Eur Heart J. 2013 Jul; 34(28):2159-219.
5. Reusz GS, Cseprekal O, Temmar M, Kis E, Cherif AB, Thaleb A, Fekete A, Szabó AJ, Benetos A, Salvi P. *Reference values of PWV in healthy children and teenagers*. Hypertension. 2010;56:217-224; Reference values of PWV in healthy children and teenagers.
6. Dabelea D, Talton JW, Wadwa RP, Urbina EM, Dolan LM, Daniels SR, Marcovina SM, Hamman RF. *Cardiovascular Risk Factors Are Associated With Increased Arterial Stiffness in Youth With Type 1 Diabetes*. The SEARCH CVD study; Diabetes Care. 2013 Dec; 36(12): 3938–3943.
7. Svensson J, Cerqueira C, Kjærsgaard P, Lyngsøe L, Hertel NT, Madsen M, Mortensen HB, Johannesen J. *Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes*. Clin Epidemiol. 2016 Oct 25;8:679-683. eCollection 2016.
8. Rodacki M, Carvalho RM, Zajdenverg L. *The potential effect of ultra-long insulin degludec on glycemic variability*.

Capítulo IV

## Conclusões



- O doseamento de BPA nas crianças com DMT1 e diabetes inaugural é muito inferior ao relatado na literatura. Este facto poderá dever-se à evicção de consumo de produtos processados por estas crianças, por indicação terapêutica, assim como ao facto de as crianças com Diabetes inaugural terem feito doseamentos após eventual período de jejum.
- As crianças do grupo controlo têm doseamentos urinários inferiores ao relatado em estudos americanos, o que pode traduzir diferentes padrões alimentares da sociedade portuguesa.
- Em relação aos ftalatos, constatou-se que a sua presença é ubiquitária, estando presente em quase todas as crianças do grupo controlo.
- A dificuldade de tirar conclusões relativamente à influência do BPA ou aos ftalatos sobre o desencadear da DMT1 pode dever-se a vários fatores, nomeadamente a sua interferência poder ser maior em determinados períodos temporais, como durante a vida fetal, neonatal ou infância; haver um mecanismo de insulinoresistência que preceda o aparecimento de autoimunidade e portanto, tenha um desfasamento temporal relativamente ao aparecimento da doença; haver mecanismos sinérgicos com outros produtos químicos; a sua curva de ação não ser monotónica, o que dificulta extraordinariamente a avaliação do seu impacto em termos de saúde pública.
- Quanto aos pesticidas organoclorados, apenas foi encontrado lindano, o que de certo modo é surpreendente, tendo em consideração que vários artigos portugueses corroboram a sua dispersão ambiental.
- Verificou-se no entanto, que o lindano existe no plasma de crianças portuguesas pré-púberes, nascidas depois da proibição da utilização deste produto, quer como escabícida, quer como pesticida. Não foi possível encontrar associação entre a sua presença e o diagnóstico de DMT1 ou o agravamento do controlo metabólico da doença, o que poderá dever-se ao reduzido tamanho amostral ou ao facto da sua pesquisa ter sido efectuada a nível sérico e não no tecido adiposo.

- No que respeita à linha de investigação que visou a pesquisa de fatores preditivos de complicações, destaca-se o risco de alterações do âmbito da síndrome metabólica em jovens diabéticas, com IMC normal. Estes resultados reforçam a necessidade de rastrear oportuna e precocemente a sua presença nas crianças e jovens diabéticas.
- É também de destacar um número elevado (42,8% da amostra) de raparigas jovens com DMT1 e que além disso, sofrem da epidemia do século 21, excesso de peso e obesidade.
- Demonstrou-se que as crianças pré-púberes com DMT1 apresentavam níveis mais elevados do que as crianças saudáveis de ácido alfa-linolénico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), assim como de ácidos gordos poli-insaturados. Esta observação atribuiu-se à intervenção nutricional efetuada, determinando um perfil menos aterogénico do que o do grupo controlo.
- As crianças com diabetes recente tinham níveis de ómega-3 superiores ao grupo controlo, contrariando alguns achados anteriores.
- Foi constatado que, crianças saudáveis apresentavam níveis elevados de ácidos gordos saturados e que, em todos os grupos analisados, ou seja, no grupo de crianças saudáveis, em crianças com diabetes recente ou estabelecida há mais de 6 meses, a relação ómega-6/ómega-3 era muito superior às habituais recomendações.
- Verificou-se ainda que as crianças diabéticas apresentam um estado antioxidante inferior às crianças saudáveis, o que poderá indiciar maior consumo destes elementos, por ocorrer maior stresse oxidativo, desde idades muito precoces.



## Referências



1. Katsarou A, Gudbjörnsdóttir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å. *Type 1 diabetes mellitus*; Nature Reviews Disease Primers 3, 17016 (2017)
2. Ziegler, A. G., Hummel, M., Schenker, M. & Bonifacio, E. *Autoantibody appearance and risk for development of childhood diabetes in offspring of parents with type 1 diabetes: the 2-year analysis of the German BABYDIAB Study*. Diabetes 48, 460–468 (1999).
3. Zeitler P, Fu J, Tandon N, Nadeau K, Urakami T, Barrett T. *Type 2 diabetes in the child and adolescent*. Pediatr Diabetes 2014; 15 (Suppl. 20): 26-46.
4. Registo DOCE - DGS, Tratamento OND.
5. Ziegler, AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainenis, Streck A. *Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children*. JAMA 309, 2473–2479 (2013).
6. *The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) study: study design*. Pediatr. Diabetes 8, 286–298 (2007).
7. Craig ME, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Seth A, Donaghue KC. *Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents*. Pediatric Diabetes 2014; 15 (Suppl. 20): 4-17.
8. SEARCH Study Group. *SEARCH for Diabetes in Youth: a multicenter study of the prevalence, incidence and classification of diabetes mellitus in youth*. Control. Clin. Trials 25, 458–471 (2004).
9. Eisenbarth, G. S. *Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease*. N. Engl. J. Med. 314, 1360-1368 (1986).
10. VanBuecken D, Lord S, Greenbaum CJ. *Changing the course of disease in Type 1 diabetes*. De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. Endotext (Internet). South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-2015 Jun 29.
11. Concannon P, Rich SS, Nepom GT. *Genetics of type 1 diabetes*. N Engl J Med 2009; 360 (16): 1646-1654.
12. Steck AK, Vehik K, Bonifacio E, Lernmark A, Ziegler AG, Hagopian WA. *Predictors of progression from the appearance of islet auto-antibodies to early childhood diabetes: the environmental determinants of diabetes in the young (TEDDY)*. Diabetes Care 2015; 38(5): 808-813.
13. Diaz-Valencia PA, Bougneres P, Valleron AJ. *Global epidemiology of type 1 diabetes in young adults and adults: a systematic review*. BMC Public Health 15, 255 (2015).
14. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*; Nature 464, 1293–1300 (2010).

15. Atkinson MA, Eisenbarth GS, Michels AW. *Type 1 diabetes*. Lancet 383, 69–82 (2014).
16. Ilonen J, Hammas A, Laine AP, Lempainen S, Vaarala O. *Patterns of  $\beta$ -cell autoantibody appearance and genetic associations during the first years of life*. Diabetes 62, 3636–3640 (2013).
17. Patterson CC, Gyurus E, Rosenbauer J, Cinek O, New A, Schober E. *Trends in childhood type 1 diabetes incidence in Europe during 1989–2008: evidence of non-uniformity over time in rates of increase*. Diabetologia 2012; 55(8):2142–2147.
18. Oilinki T, Otonkoski T, Ilonen J, Knip M, Miettinen PJ. *Prevalence and characteristics of diabetes among Somali children and adolescents living in Helsinki, Finland*; Pediatr Diabetes, 13 (2012), pp. 176–180.
19. Kondrashova A, Reunanen A, Romanov A, Karvonen A, Viskari H, Viskari T. *A six-fold gradient in the incidence of type 1 diabetes at the eastern border of Finland*. Ann Med, 37 (2005), pp. 67–72.
20. Rewers M, Ludvigsson J. *Environmental risk factors for type 1 diabetes*. The Lancet, Volume 387, Issue 10035, 4–10 June 2016, Pages 2340–2348.
21. Lamb MM, Yin X, Barriga K, Hottman MR, Boron AE, Eisenbarth GS. *Dietary glycemic index, development of islet autoimmunity, and subsequent progression to type 1 diabetes in young children*. J Clin Endocrinol Metab, 93 (2008), pp. 3936–3942.
22. Ludvigsson J. *Why diabetes incidence increases - a unifying theory*. Ann N Y Acad Sci, 1079 (2006), pp.374–382.
23. Sonnenschein C, Soto A. Nat Rev Endocrinol, 2010, 6, 363–70; *Environmental causes of cancer: endocrine disruptors as carcinogens*.
24. Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA (1996). *Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop*. Environ Health Perspect 104: suppl 4: 715–740.
25. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. (2009). *Endocrine-Disrupting chemicals: an Endocrine Society Scientific Statement*. Endocrine Reviews; 30 (4): 293–342.
26. Crews D, Putz O, Thomas P, Hayes T, Howdeshell K (2003). *Animal models for the study of the effects of mixtures, low doses, and the embryonic environment on the action of endocrine disrupting chemicals*. SCOPE/IUPAC Project Implications of endocrine active substances for human and wildlife, 2003; 75: 2305–20.
27. White CR, Seymour RS; *Allometric scaling of mammalian metabolism*. J Exp Biol 2005; 208:1611–1619.
28. Barker DJP. *The developmental origins of adult disease*. Eur J Epidemiol 2003, 18: 733–36.
29. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. *Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure*. Human Reproduction, 2002, 17 (11): 2839–2841.

30. Boo H, Harding J. *The developmental origins of adult disease (Barker) Hypothesis*. Australian and New Zealand J Obst Gynaec 2006; 46: 4-14.
31. Jeng Y, Watson CS. *Combinations of physiologic estrogens with xenoestrogens alter calcium and kinase responses, prolactin release, and membrane estrogen receptor trafficking in rat pituitary cells*; Environmental Health 2010, 61 (9): 3-13.
32. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med 1993; 329: 977-986.
33. Järvisalo MJ, Raitakari M, Toikka JO, Putto-Laurila A, Rontu R, Laine S, Lehtimäki T, Rönnemaa T, Viikari J, Raitakari OT. *Endothelial dysfunction and increased arterial intima-media thickness in children with type 1 diabetes*. Circulation 2004; 109: 1750-1755.
34. Cé GV, Rohde LE, da Silva AM, Puñales MK, de Castro AC, Bertoluci MC. *Endothelial dysfunction is related to poor glycemic control in adolescents with type 1 diabetes under 5 years of disease: evidence of metabolic memory*. J Clin Endocrinol Metab 2011; 96: 1493-1499.
35. Heldring N, Pike A, Anderson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, 2007. *Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets*. Physiol rev 87: 905-931.
36. Barros RP, Machado UF, Gustafsson JA, 2006. *Estrogen receptors: new players in diabetes mellitus*. trends Mol Med 12: 425-431.
37. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Soriano S, Quesada I, Nadal A. *Bisphenol-A: a new diabetogenic factor?* HORMONES 2010, 9(2):118-126.
38. Dodds EC, Lawson W; *Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus*. Nature, 1936, 137: 996.
39. Kang JH, Kondo F, Katayama Y; *Human exposure to bisphenol a*. 2006 Toxicology 226: 79-89.
40. Calafat AM, Kuklenyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J, Needham LL. *Urinary concentrations of bisphenol a and 4-nonylphenol in a human reference population*. Environ Health Perspect, 2005, 113: 391-395.
41. Richter C, Birnbaum LS, Farabolini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE. *In vivo effects of bisphenol a in laboratory rodent studies*. Reprod toxicol , 2007, 24: 199-224.
42. Alonso-Magdalena P, Laribi O, Ropero AB, Fuentes E, Ripoll C et al. *Low doses of bisphenol a and diethylstilbestrol impair Ca<sup>2+</sup> signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans*. Environ Health Perspect, 2005, 113: 969-977.
43. Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A. *The estrogenic effect of bisphenol a disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance*. Environ Health Perspect, 2006; 114: 106-112.
44. Bodina J, Bøllingb AK, Wendtc A, Eliassonc L, Becherb R, Kuperd F, Løvike M, Nygaard UC. *Exposure to bisphenol A, but not phthalates, increases spontaneous diabetes type 1 development in NOD mice*. Toxicology Reports (2015); 2: 99-110

45. Bertelsen RJ, Carlsen KC, Calafat AM, Hoppin JA, Haland G, Mowinckel P, Lovik M. *Urinary biomarkers for phthalates associated with asthma in Norwegian children*, *Environ. Health Perspect.* 121 (2) (2013) 251–256.
46. Bornehag CG, Sundell J, Weschler CJ, Sigsgaard T, Lundgren B, Hasselgren M, Hagerhed-Engman L; *The association between asthma and allergic symptoms in children and phthalates in house dust: a nested case–control study*; *Environ. Health Perspect.* 112 (14) (2004) 1393–1397.
47. Melzer D, Rice NE, Lewis C, Henley WE, Galloway TS. *Association of urinary bisphenol a concentration with heart disease: evidence from NHANES 2003/06*, *PLoS ONE* 5 (1) (2010) e8673.
48. Pal S, Sarkar K, Nath PP, Mondal M, Khatun A, G Paul; *Bisphenol S impairs blood functions and induces cardiovascular risks in rats*; *Toxicology Reports* Volume 4, 2017, Pages 560-565.
49. Liao C, Liu F, Kannan. *S-Bisphenola new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol a residues*. *Environ. Sci. Technol.*, 46 (12) (2012), pp.6515-6522.
50. Wittassek M, Heger W, Koch HM, Becker K, Angerer J, Kolossa-Gehring M. *Daily intake of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) by German children-A comparison of two estimation models based on urinary DEHP metabolite levels*. *Int J Hyg Environ Health*, 210 (2007) 35-42.
51. US CDC. *Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. <http://www.cdc.gov/exposurereport>.
52. Baillie-Hamilton PF. *Chemical toxins: a hypothesis to explain the global obesity epidemic*. *J Altern Complement Med*, 2002, 8(2):185-192.
53. Hauser R, Calafat AM. *Phthalates and human health*. *Occup Environ Med*, 2005, 62(11):806-818.
54. Guo M, Lai L, Zong T, Lin Y, Yang B, Zhang L, Li M, Kuang H. *Exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate inhibits luteal function via dysregulation of CD31 and prostaglandinF2alpha in pregnant mice*. *Reprod Biol Endocrinol.* 13 (2015) 11.
55. Casals-Casas C, Feige JN, Desvergne B. *Interference of pollutants with PPARs: endocrine disruption meets metabolism*. *Int J Obes (Lond)*, 2008, 32(suppl 6):S53-S61.
56. Desvergne B, Feige JN, Casals-Casas C. *PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic?* *Mol Cell Endocrinol* , 2009, 304(1-2):43-48.
57. Grun F, Blumberg B. *Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis*. *Rev Endocr Metab Disord*, 2007, 8(2):161-171.
58. She Y, Jiang L, Zheng L, Zuo H, Chen M, Sun X, Li Q, Geng C, Yang G, Jiang L, Liu X. *The role of oxidative stress in DNA damage in pancreatic  $\beta$  cells induced by di-(2- ethylhexyl) phthalate*, *Chemico-Biological Interactions* (2017), doi: 10.1016/j.cbi.2017.01.015
59. Mushtaq M, Srivastava SP, Seth PK. *Effect of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on glycogen metabolism in rat liver*. *Toxicology.* 16 (1980) 153-161.
60. Kim JH, Park HY, Bae S, Lim YH, Hong YC. *Diethy lhexyl Phthalates Is Associated with Insulin Resistance via Oxidative Stress in the Elderly: A Panel Study*. *PLoS One.* 8 (2013) e71392.

61. Lin Y, Wei J, Li Y, Chen J, Zhou Z, Song L, Wei Z, Lv Z, Chen X, Xia W, Xu S. *Developmental exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs endocrine pancreas and leads to long-term adverse effects on glucose homeostasis in the rat.* Am J Physiol Endocrinol Metab. 301 (2011) E527-E538.
62. Caldwell JC. *DEHP: genotoxicity and potential carcinogenic mechanisms - a review.* Mutat Res. 751 (2012) 82-157
63. Jayaraj R, Megha P, Sreedev P. *Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment.* Interdiscip Toxicol, 2016 Dec; 9 (3-4): 90-100.
64. Weber R1, Gaus C, Tysklind M, Johnston P, Forter M, Hollert H, Heinisch E, Holoubek I, Lloyd-Smith M, Masunaga S, Moccarelli P, Santillo D, Seike N, Symons R, Torres JP, Verta M, Varbelow G, Vijgen J, Watson A, Costner P, Woelz J, Wycisk P, Zennegg M. *Dioxin - and POP - contaminated sites - contemporary and future relevance and challenges: overview on background, aims and scope of the series.* Environ Sci Pollut Res Int. 2008 Jul;15(5):363-93.
65. Augustijn-Beckers PW, Hornsby AG, Wauchope RD. *Additional Properties Reviews of Environmental Contamination and Toxicology.* SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decisionmaking II. 1994:137.
66. Quijano R. *Endosulfan poisoning in Kasaragod, Kerala, India, Report on a fact finding mission,* PAN. 2002
67. Blanck HM, Marcus M, Tolbert PE et al. *Age at menarche and Tanner stage in girls exposed in utero and postnatally to polybrominated biphenyl.* Epidemiology 2000; 11: 641-7.
68. Rasier G, Parent AS, Gerard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP. *Early maturation of GnRH secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyl-trichloroethane.* Biology of reproduction 2007, 77, 734-42.
69. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebek NE, Toppari J et al. *The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration.* Endocr Rev 2003; 24: 668-93.
70. Roy JR, Chakraborty S, Chakraborty TR. *Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans - a review.* Med Sci Monit 2009 Jun; 15 (6): RA 137-45.
71. Evangelou E, Ntritsos G, Chondrogiorgi M, Kavvoura FK, Hernández AF, Ntzani EE, Tzoulaki I. *Exposure to pesticides and diabetes: A systematic review and meta-analysis.* Environ Int. 2016 May;91:60-8.
72. Liston A, Todd JA, Lagou V. *Beta-Cell Fragility As a Common Underlying Risk Factor in Type 1 and Type 2 Diabetes.* Trends Mol Med. 2017 Feb;23(2):181-194.
73. Desforges JP, Sonne C, Levin M, Siebert U, De Guise S, Dietz R. *Immunotoxic effects of environmental pollutants in marine mammals.* Environ Int. 2016 Jan;86:126-39.
74. Libby P, Nathan DM, Abraham K, Brunzell JD, Fradkin JE, Haffner SM, et al. *Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute - National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases working group on cardiovascular complications of type 1 diabetes mellitus.* Circulation. 2005;111(25):3489-93.

75. Gerstein, H. C. *Diabetes: dysglycaemia as a cause of cardiovascular outcomes*. Nat. Rev. Endocrinol. 11, 508-510 (2015).
76. Slattery D, Choudhary D. *Vlinical use of continuous glucose monitoring in adiltis with type 1 diabetes mellitus*. Diabetes Technol Ther 2017 May; 19 (S2): S55-S61.
77. American Diabetes Association. 5. *Glycemic targets*. Diabetes Care 39, S39–S46 (2016).
78. Rewers MJ, Pillay K, de Beaufort C, Craig ME, Hanas R, Acerini CL, Maahs DM; International Society for Pediatric and Adolescent Diabetes.; ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2014. *Assessment and monitoring of glycemic control in children and adolescents with diabetes*. Pediatr Diabetes. 2014 Sep;15 Suppl 20:102-14. doi: 10.1111/pedi.12190.
79. Ferranti SD, de Boer IH, Fonseca V, Fox CS, Golden SH, Lavie CJ, et al. *Type 1 diabetes mellitus and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association and American Diabetes Association*. Diabetes Care. 2014;37(10):2843-63.
80. Nathan DM, Lachin J, Cleary P, Orchard T, Brillon DJ, Backlund JY et al. *Intensive diabetes therapy and carotid intima-media thickness in type 1 diabetes mellitus*. N Engl J Med (2003) 348, 2294-2303.
81. E Gourgari, D Dabelea, K Rother; *Modifiable Risk Factors for Cardiovascular Disease in Children with Type 1 Diabetes: Can Early Intervention Prevent Future Cardiovascular Events?* Current Diabetes Reports, 2017; Dec, 17: 134.
82. Townsend RR, Wilkinson IB, Schiffrin EL, Avolio AP, Chirinos JA, Cockcroft JR, et al. *Recommendations for improving and standardizing vascular research on arterial stiffness: a scientific statement from the American Heart Association*. Hypertension. 2015;66(3):698-72.
83. Haller MJ, Samyn M, Nichols WW, Brusko T, Wasserfall C, Schwartz RF et al. *Radial artery tonometry demonstrates arterial stiffness in children with type 1 diabetes*. Diabetes Care. 2004;27(12):2911-7.
84. Urbina EM, Wadwa RP, Davis C, Snively BM, Dolan LM, Daniels SR, et al. *Prevalence of increased arterial stiffness in children with type 1 diabetes mellitus differs by measurement site and sex: the SEARCH for diabetes in youth study*. J Pediatr. 2010;156(5):731–7. 7 e1.
85. Bradley TJ, Slorach C, Mahmud FH, Dunger DB, Deanfield J, Deda L, et al. *Early changes in cardiovascular structure and function in adolescents with type 1 diabetes*. Cardiovasc Diabetol. 2016;15:31.
86. Writing Group for the DCCT/EDIC Research Group. *Coprogession of cardiovascular risk factors in type 1 diabetes during 30 years of follow-up in the DCCT/EDIC Study*. Diabetes Care. 2016;39(9):1621-30.
87. Petitti DB, Imperatore G, Palla SL, Daniels SR, Dolan LM, Kershner AK et al. *Serum lipids and glucose control: the SEARCH for diabetes in youth study*. Arch Pediatr Adolesc Med. 2007;161(2):159-65.
88. Eltayeb AA, Ahmad FA, Sayed DM, Osama AM. *Subclinical vascular endothelial dysfunctions and myocardial changes with type 1 diabetes mellitus in children and adolescents*. Pediatr Cardiol. 2014;35(6):965-74.



89. Guy J, Ogden L, Wadwa RP, Hamman RF, Mayer-Davis EJ, Liese AD, *et al.* *Lipid and lipoprotein profiles in youth with and without type 1 diabetes: the SEARCH for diabetes in youth case-control study.* Diabetes Care. 2009;32(3):416-20.
90. Bjornstad P, Nguyen N, Reinick C, Maahs DM, Bishop FK, Clements SA, *et al.* *Association of apo-lipoprotein B, LDL-C and vascular stiffness in adolescents with type 1 diabetes.* Acta Diabetol. 2015;52(3):611-9.
91. Calder PC, *Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale.* Biochimie, vol. 91, no. 6, pp. 791–795, 2009.
92. Wu MY, Li CJ, Hou MF, Chu PY. *New Insights into the Role of Inflammation in the Pathogenesis of Atherosclerosis.* Int J Mol Sci 2017 Sep 22; 18 (10).
93. Zhou, S.M.; Chadipiralla, K.; Mendez, A.J.; Jaimes, E.A.; Silverstein, R.L.; Webster, K.; Raij, L. *Nicotine Potentiates Proatherogenic Effects of OxLDL by Stimulating and Upregulating Macrophage CD36 Signaling.* Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2013, 305, H563–H574.
94. Frostegård, J.; Ruihua, W.U.; Lemne, C.; Thulin, T.; Witztum, J.L.; de Faire, U. *Circulating Oxidized Low-Density Lipoprotein Is Increased in Hypertension.* Clin. Sci. 2003, 105, 615-620.
95. Wisniewska, A.; Olszanecki, R.; Toton-Zuranska, J.; Kus, K.; Stachowicz, A.; Suski, M.; Gebska, A.; Gajda, M.; Jawien, J.; Korbust, R. *Anti-Atherosclerotic Action of Agmatine in ApoE-Knockout Mice.* Int. J. Mol. Sci. 2017, 18, 1706.
96. Choi, H.S.; Harkewicz, R.; Lee, J.H.; Boullier, A.; Almazan, F.; Li, A.C.; Witztum, J.L.; Bae, Y.S.; Miller, Y.I. *Lipoprotein Accumulation in Macrophages Via Toll-Like Receptor-4-Dependent Fluid Phase Uptake.* Circ. Res. 2009, 104, 1355–1363.
97. D Burtenshaw, R Hakimjavadi, EM Redmond, PA Cahill. *Reactive Oxygen Species and Regulation of Vascular Cell Fate.* Antioxidants 2017, 6, 90.
98. Loot, A.E.; Schreiber, J.G.; Fisslthaler, B.; Fleming, I. *Angiotensin II impairs endothelial function via tyrosine phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase.* J. Exp. Med. 2009, 206, 2889-2896.
99. Cahill, P.A.; Redmond, E.M. *Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health.* Atherosclerosis 2016, 248, 97–109.
100. Varadharaj S, Kelly OJ, Khyat RN, Kumar PS, Ahmed N, Zweier JL. *Role of dietary antioxidants in the preservation of vascular function and the modulation of health and disease.* Front Cardio-vasc Med, nov 2017, doi.org/10.3389/fcvm.2017.00064.
101. Pjanic M. *The role of polycarbonate monomer bisphenol-A in insulin resistance.* PeerJ; 2017: 5:e3809 <https://doi.org/10.7717/peerj.3809>.
102. Welshons WV, Nagel SC, Vom Saal FS. 2006. *Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol a at levels of human exposure.* Endocrinology 147:s56-s69.
103. Merchant Research & Consulting Ltd. 2017. *Bisphenol A (BPA): 2017 World Market Outlook and Forecast up to 2021* (accessed 23 June 2017).

104. Talsness CE, Andrade AJM, Kuriyama SN, Taylor JA, Vom Saal FS. *Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 2009, 364:2079-2096.
105. Huang YQ, Wong CKC, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlström B, Neretin L, Wong MH. *Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts*. Environment International, 2012, 42:91-99.
106. Repossi A, Farabegoli F, Gazzotti T, Zironi E, Pagliuca G. *Bisphenol A in edible part of sea-food*. Italian Journal of Food Safety, 2016, 5:98-105.
107. Biedermann S, Tschudin P, Grob K. *Transfer of bisphenol A from thermal printer paper to the skin*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 398:571-576.
108. Ehrlich S, Calafat AM, Humblet O, Smith T, Hauser R. *Handling of thermal receipts as a source of exposure to bisphenol A*. JAMA, 2014, 311:859-860.
109. López-Cervantes J, Paseiro-Losada P. *Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging*. Food Additives and Contaminants, 2003, 20:596-606.
110. Liao C, Kannan K. *Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61:4655-4662.
111. Liao C, Liu F, Guo Y, Moon H-B, Nakata H, Wu Q, Kannan K. *Occurrence of eight bisphenol analogues in indoor dust from the United States and several Asian countries: implications for human exposure*. Environmental Science & Technology, 2012, 46:9138-9145.
112. Flint S, Markle T, Thomson S, Wallace E. *Bisphenol A exposute, effects, and policy: a wildlife perspective*. J Environ Manage. 2012 Aug 15; 104: 19-34.
113. Verbanck M, Canouil M, Leloire A, Dhennin V, Coumoul X, Yengo L, Froguel P, Poulain-Godefroy O. *Low-dose exposure to bisphenols A, F and S of human primary adipocyte impacts coding and non-coding RNA profiles*. PLOS ONE, 2017, 12:e0179583.
114. Rubin BS. *Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 127:27-34.
115. EFSA CEF Panel (EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids), 2015. *Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Executive summary*. EFSA Journal 2015;13 (1):3978, 23 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3978.
116. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. *Human exposure to bisphenol A (BPA)*. Reproductive Toxicology, 2007, 24:139-177.
117. Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. *Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit*. Environmental Health Perspectives, 2002, 110:A703-A707.
118. Todaka E, Mori C. *Necessity to establish new risk assessment and risk communication for human fetal exposure to multiple endocrine disruptors in Japan*. Congenital Anomalies, 2002, 42:87-93.

119. Ye X, Kuklenyik Z, Needham LL, Calafat AM. *Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching- high performance liquid chromatography - isotope dilution tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography, 2006, B 831:110-115.
120. Dodds EC, Lawson W. *Molecular structure in relation to oestrogenic activity. compounds without a phenanthrene nucleus*. Proceedings of the Royal Society of London. 1938, Series B, Biological Sciences 125:222-232.
121. Okada H, Tokunaga T, Liu X, Takayanagi S, Matsushima A, Shimohigashi Y. *Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol a to human estrogen-related receptor- $\gamma$* . Environmental Health Perspectives , 2008, 116:32-38.
122. AlonsoMagdalena P, Ropero AB, Soriano S, GarciaArévalo M, Ripoll C, Fuentes E, Quesada I, Nadal Á. *Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2012, 355:201-207.
123. Judy BM, Welshons WV. 2010. *Cellular localization of receptors mediating the actions of steroid hormones*. Comprehensive Physiology , 2010, 17:437-460.
124. Alonso-Magdalena P, Ropero AB, Carrera MP, Cederroth CR, Baquié M, Gauthier BR, Nef S, Stefani E, Nadal A. *Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha*, 2008, PLOS ONE 3: e2069.
125. Fernandez MF, Arrebola JP, Taoufiki J, Navalón A, Ballesteros O, Pulgar R, Vilchez JL, Olea N. *Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women*. Reprod Toxicol 2007 Aug-Sep; 24 (2): 259-64.
- 126 - Ye, X., Wong LY, Bishop AM, Calafat AM. *Variability of urinary concentrations of bisphenol a in spot samples, first morning voids, and 24-hour collections*. Environmental Health Perspectives, 2011, 119 (7):983-8.
127. <https://www.epa.gov/sites/production/.../biomonitoring-bpa.pdf> (assessed Dec 2017)
128. Rudel RA, Gray JM, Engel CL, Rawsthorne TW, Dodson RE, Ackerman JM, Rizzo J, Nudelman JL, Brody JG. *Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: findings from a dietary intervention*. Environ Health Perspect. 2011 Jul; 119(7):914-20.
129. Johns LE, Cooper GS, Galizia A, Meeker JD. *Exposure assessment issues in epidemiology studies of phthalates*. Environ Int. 2015 Dec; 85():27-39.
130. Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. *Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004*, Environ Health Perspect. 2008 Jan; 116(1):39-44.
131. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, Maghuin-Rogister G, Pironnet AM, Pussemier L, Scippo ML, Van Loco J, Covaci A. *A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A*. Food Chem Toxicol. 2012 Oct; 50(10):3725-40.
132. Watkins DJ, Eliot M, Sathyanarayana S, Calafat AM, Yolton K, Lanphear BP, Braun JM. *Variability and predictors of urinary concentrations of phthalate metabolites during early childhood*. Environ Sci Technol. 2014; 48(15):8881-90.

133. Monteiro CA, Moubarac JC, Levy RB, Canella DS, Louzada MLDC, Cannon G. *Household availability of ultra-processed foods and obesity in nineteen European countries*. Public Health Nutr. 2018 Jan;21(1):18-26. doi: 10.1017/S1368980017001379. Epub 2017 Jul 17.
134. Cetkovic-Cvrlje M, Thinamany S, Bruner KA. *Bisphenol A (BPA) aggravates multiple low-dose streptozotocin-induced Type 1 diabetes in C57BL/6 mice*. J Immunotoxicol. 2017 Dec;14(1):160-168. doi: 10.1080/1547691X.2017.1334722.
135. Valentino R, D'Esposito V, Ariemma F, Cimmino I, Beguinot F, Formisano P; *Bisphenol A environmental exposure and the detrimental effects on human metabolic health: is it necessary to revise the risk assessment in vulnerable population*. Journal of Endocrinological Investigation; March 2016, Volume 39, Issue 3, pp 259-263.
136. Liu J, Yu P, Qian W, Li Y, Zhao J, Huan F, Wang J, Xiao H. *Perinatal bisphenol A exposure and adult glucose homeostasis: identifying critical windows of exposure*. PLoS One. 2013, 8(5):e64143. doi:10.1371/journal.pone.0064143.
137. Kuo, C.H.; Yang, S.N.; Kuo, P.L.; Hung, C.H. *Immunomodulatory effects of environmental endocrine disrupting chemicals*. Kaohsiung J. Med. Sci. 2012, 28, S37–S42.
138. Hirahara, K.; Nakayama, T. *CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: Beyond the Th1/Th2 paradigm*. Int. Immunol. 2016, 28, 163-171.
139. Casati, L.; Sendra, R.; Sibilia, V.; Celotti, F. *Endocrine disrupters: The new players able to affect the epigenome*. Front. Cell Dev. Biol. 2015, 3.
140. Dhimolea, E.; Wadia, P.R.; Murray, T.J.; Settles, M.L.; Treitman, J.D.; Sonnenschein, C.; Shioda, T.; Soto, A.M. *Prenatal exposure to BPA alters the epigenome of the rat mammary gland and increases the propensity to neoplastic development*. PLoS ONE 2014, 9.
141. Khan, D.; Ahmed, S.A. *Epigenetic Regulation of Non-Lymphoid Cells by Bisphenol A, a Model Endocrine Disrupter: Potential Implications for Immunoregulation*. Front. Endocrinol. 2015, 6.
142. Alonso-Magdalena P, García-Arévalo M, Quesada I, Nadal Á. *Bisphenol-a treatment during pregnancy in mice: a new window of susceptibility for the development of diabetes in mothers later in life*. Endocrinology, 2015, 156(5):1659-1670.
143. Valitsky M, Hoffman A, Unterman T, Bar-Tana J. *Insulin sensitizer prevents and ameliorates experimental type 1 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2017 Dec 1;313(6):E672-E680.
144. Odegaard JI, Chawla A. *Connecting Type 1 and Type 2 Diabetes through Innate Immunity*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012 Mar; 2(3): a007724.
145. Shulman GI. *Cellular mechanisms of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000, 106: 171-176.
146. Hotamisligil GS. *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010, 140: 900–917.
147. Boni-Schnetzler M, Thorne J, Parnaud G, Marselli L, Ehse JA, Kerr-Conte J, Pattou F, Halban PA, Weir GC, Donath MY. *Increased interleukin (IL)-1 $\beta$  messenger ribonucleic acid expression in  $\beta$ -cells of individuals with type 2 diabetes and regulation of IL-1 $\beta$  in human islets by glucose and autostimulation*. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93: 4065-4074.

148. Eizirik DL. *Interleukin-1 induced impairment in pancreatic islet oxidative metabolism of glucose is potentiated by tumor necrosis factor*. Acta Endocrinol (Copenh), 1988, 119: 321-325.
149. Elouil H, Cardozo AK, Eizirik DL, Henquin JC, Jonas JC. *High glucose and hydrogen peroxide increase c-Myc and haeme-oxygenase 1 mRNA levels in rat pancreatic islets without activating NFκB*. Diabetologia, 2005, 48: 496-505.
150. Rochester JR, Bolden AL. *Bisphenol S and F: a systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes*. Environ Health Perspect. 2015; doi:10.1289/ehp.1408989.
151. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, Toppari J, Zoeller RT. *EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals*. Endocr Rev. 2015 Dec; 36(6): E1–E150. doi: 10.1210/er.2015-1010.
152. Herrick RF, McClean MD, Meeker JD, Baxter LK, Weymouth GA. *An unrecognized source of PCB contamination in schools and other buildings*. Environ Health Perspect. 2004 Jul; 112(10):1051-3.
153. Sims EA; *Are there persons who are obese, but metabolically healthy?* Metabolism. 2001 Dec; 50(12):1499-504.
154. Gregg EW, Cheng YJ, Narayan KM, Thompson TJ, Williamson DF. *The relative contributions of different levels of overweight and obesity to the increased prevalence of diabetes in the United States: 1976-2004*. Prev Med. 2007 Nov; 45(5):348-52.
155. Billings LK, Florez JC. *The genetics of type 2 diabetes: what have we learned from GWAS?* Ann N Y Acad Sci. 2010 Nov; 1212():59-77.
156. Lee DH, Porta M, Jacobs DR, Vandenberg L. *Chlorinated persistent organic pollutants, obesity and Type 2 diabetes*. Endocr Rev 2014 Aug; 35 (4); 557-601.
157. Thayer KA, Heindel JJ, Bucher JR, Gallo MA. *Role of environmental chemicals in diabetes and obesity: a National Toxicology Program workshop review*. Environ Health Perspect. 2012 Jun; 120(6):779-89.
158. Taylor KW, Novak RF, Anderson HA, Birnbaum LS, Blystone C, Devito M, Jacobs D, Köhrle J, Lee DH, Rylander L, Rignell-Hydbom A, Tornero-Velez R, Turyk ME, Boyles AL, Thayer KA, Lind L. *Evaluation of the association between persistent organic pollutants (POPs) and diabetes in epidemiological studies: a national toxicology program workshop review*. Environ Health Perspect. 2013 Jul; 121(7):774-83.
159. Lee DH, Lee IK, Song K, Steffes M, Toscano W, Baker BA, Jacobs DR Jr. *A strong dose-response relation between serum concentrations of persistent organic pollutants and diabetes: results from the National Health and Examination Survey 1999-2002*. Diabetes Care. 2006 Jul; 29(7):1638-44.
160. Lee DH, Jacobs DR Jr, Porta M. *Could low-level background exposure to persistent organic pollutants contribute to the social burden of type 2 diabetes?* J Epidemiol Community Health. 2006 Dec; 60(12):1006-8.
161. Airaksinen R, Rantakokko P, Eriksson JG, Blomstedt P, Kajantie E, Kiviranta H. *Association between type 2 diabetes and exposure to persistent organic pollutants*. Diabetes Care. 2011 Sep; 34(9):1972-9.

162. Gasull M, Pumarega J, Téllez-Plaza M, Castell C, Tresserras R, Lee DH, Porta M. *Blood concentrations of persistent organic pollutants and prediabetes and diabetes in the general population of Catalonia*. Environ Sci Technol. 2012 Jul 17; 46(14):7799-810.
163. Longnecker MP. *Pharmacokinetic variability and the miracle of modern analytical chemistry*. Epidemiology. 2006 Jul; 17(4):350-1.
164. Turyk M, Anderson H, Knobeloch L, Imm P, Persky V. *Organochlorine exposure and incidence of diabetes in a cohort of Great Lakes sport fish consumers*. Environ Health Perspect. 2009 Jul; 117(7):1076-82.
165. Michalek JE, Ketchum NS, Tripathi RC. *Diabetes mellitus and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin elimination in veterans of Operation Ranch Hand*. J Toxicol Environ Health A. 2003 Feb 14; 66(3):211-21.
166. Irigaray P, Newby JA, Lacomme S, Belpomme D. *Overweight/obesity and cancer genesis: more than a biological link*. Biomed Pharmacother. 2007 Dec; 61(10):665-78.
167. Ruzzin J, Petersen R, Meugnier E, Madsen L, Lock EJ, Lillefosse H, Ma T, Pesenti S, Sonne SB, Marstrand TT, Malde MK, Du ZY, Chavey C, Fajas L, Lundebye AK, Brand CL, Vidal H, Kristiansen K, Frøylund L. *Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome*. Environ Health Perspect. 2010 Apr; 118(4):465-71.
168. Kiviranta H, Tuomisto JT, Tuomisto J, Tukiainen E, Vartiainen T. *Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls in the general population in Finland*. Chemosphere. 2005 Aug; 60(7):854-69.
169. Ibrahim MM, Fjære E, Lock EJ, Naville D, Amlund H, Meugnier E, Le Magueresse Battistoni B, Frøylund L, Madsen L, Jessen N, Lund S, Vidal H, Ruzzin J. *Chronic consumption of farmed salmon containing persistent organic pollutants causes insulin resistance and obesity in mice*. PLoS One. 2011; 6(9):e25170.
170. Ibrahim MM, Fjære E, Lock EJ, Frøylund L, Jessen N, Lund S, Vidal H, Ruzzin J. *Metabolic impacts of high dietary exposure to persistent organic pollutants in mice*. Toxicol Lett. 2012 Nov 23; 215(1):8-15.
171. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. *Inflammation and insulin resistance*. J Clin Invest. 2006 Jul; 116(7):1793-801.
172. Howell G 3<sup>rd</sup>, Mangum L. *Exposure to bioaccumulative organochlorine compounds alters adipogenesis, fatty acid uptake, and adipokine production in NIH3T3-L1 cells*. Toxicol In Vitro. 2011 Feb; 25(1):394-402.
173. Kim MJ, Pelloux V, Guyot E, Tordjman J, Bui LC, Chevallier A, Forest C, Benelli C, Clément K, Barouki R. *Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells*. Environ Health Perspect. 2012 Apr; 120(4):508-14.
174. Fisher BE; Most unwanted. *Environ Health Perspect*. 1999 Jan; 107(1):A18-23.
175. Suedel BC, Boraczek JA, Peddicord RK, Clifford PA, Dillon TM. *Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems*. Rev Environ Contam Toxicol. 1994; 136():21-89.



176. Porta M, Puigdomènech E, Ballester F, Selva J, Ribas-Fitó N, Llop S, López T. *Monitoring concentrations of persistent organic pollutants in the general population: the international experience*. Environ Int. 2008 May; 34(4):546-61.
177. Phillips TM, Seech AG, Lee H, Trevors JT. *Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms*. Biodegradation. 2005 Aug;16(4):363-92.
178. Miller JC. *Statistics for Analytical Chemistry*. Ellis Horwood; 1992. 227 p.
179. [www.europarl.europa.eu/.../IPOL\\_STU\(2016\)571398\\_EN.pdf](http://www.europarl.europa.eu/.../IPOL_STU(2016)571398_EN.pdf) (assessed Jan 2017).
180. Vijgen, J., Abhilash, P. C., Li Y.F., Lal, R., Forter, M., Torres, J., Singh, N., Yunus, M., Tian, G. and Schäffer, A. *Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers*; Environmental Science and Pollution Research Vol., 2011, 18(2), 152- 162.
181. IARC, (2016). *Carcinogenicity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*. Volume 113 of the IARC Monographs. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol113/index.php>.
182. ATSDR. Toxicological profile for hexachlorocyclohexanes. U. S. Department of Health & Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. August, 2005. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp43.html>.
183. Ulutaş OK, Çok İ, Darendeliler F, Aydın B, Çoban A, Henkelmann B, Schramm KW. *Blood concentrations and risk assessment of persistent organochlorine compounds in newborn boys in Turkey. A pilot study*. Environ Sci Pollut Res Int. 2015 Dec;22(24):19896-904. doi: 10.1007/s11356-015-5179-y. Epub 2015 Aug 21.
184. Appenzeller BMR, Hardy EM, Grova N, Chata C, Faÿs F, Briand O, Schroeder H, Duca RC. *Hair analysis for the biomonitoring of pesticide exposure: comparison with blood and urine in a rat model*. Arch Toxicol. 2017 Aug;91(8):2813-2825. doi: 10.1007/s00204-016-1910-9. Epub 2016 Dec 23.
185. Stabili L, Pagliara P. *The sea urchin Paracentrotus lividus immunological response to chemical pollution exposure: The case of lindane*. Chemosphere. 2015 Sep;134:60-6. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.04.006. Epub 2015 Apr 22.
186. Henríquez-Hernández LA, Luzardo OP, Valerón PF, Zumbado M, Serra-Majem L, Camacho M, González-Antuña A, Boada LD. *Persistent organic pollutants and risk of diabetes and obesity on healthy adults: Results from a cross-sectional study in Spain*. Sci Total Environ. 2017 Dec 31;607-608:1096-1102. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.07.075. Epub 2017 Jul 27.
187. Al-Othman A, Yakout S, Abd-Alrahman SH, Al-Daghri NM. *Strong associations between the pesticide hexachlorocyclohexane and type 2 diabetes in Saudi adults*. Int J Environ Res Public Health. 2014 Aug 29;11(9):8984-95. doi: 10.3390/ijerph110908984.
188. Coscollà C, López A, Yahyaoui A, Colin P, Robin C, Poinsignon Q, Yusà V. *Human exposure and risk assessment to airborne pesticides in a rural French community*. Sci Total Environ. 2017 Apr 15;584-585:856-868. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.01.132. Epub 2017 Feb 1.

189. Thomas M, Lazartigues A, Banas D, Brun-Bellut J, Feidt C. *Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in sediments and fish from freshwater cultured fish ponds in different agricultural contexts in north-eastern France*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012 Mar;77:35-44. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.10.018. Epub 2011 Nov 8.
190. Pinto MI, Vale C, Sontag G, Noronha JP. *Pathways of priority pesticides in sediments of coastal lagoons: The case study of Óbidos Lagoon, Portugal*. *Mar Pollut Bull*. 2016 May 15;106 (1-2):335-40.
191. Cruzeiro C, Amaral S, Rocha E, Rocha MJ. *Determination of 54 pesticides in waters of the Iberian Douro River estuary, and risk assessment of environmentally relevant mixtures using theoretical approaches and Artemia Salina and Daphnia magna bioassays*. *Ecotoxicology and Environmental safety*, 2017, 145; 126-134.
192. Scott GR, Chosidow O; IUSTI/WHO. *European guideline for the management of scabies, 2010*. *Int J STD AIDS* 2011; 22:301-3.
193. Jantunen LMM, Bidleman TF, Harner T, Parkhurst WJ. *Toxaphene, chlordane, and other organochlorine pesticides in Alabama air*. *Environ. Sci. Technol*. 2000;34:5097-5105.
194. Marushka L, Batal M, David W, Schwartz H, Ing A, Fediuk K, Sharp D, Black A, Tikhonov C, Chan HM. *Association between fish consumption, dietary omega-3 fatty acids and persistent organic pollutants intake, and type 2 diabetes in 18 First Nations in Ontario, Canada*. *Environ Res*. 2017 Jul;156:725-737.
195. Pestana D, Faria G, Sá C, Fernandes VC, Teixeira D, Norberto S, Faria A, Meireles M, Marques C, Correia-Sá L, Cunha A, Guimarães JT, Taveira-Gomes A, Santos AC, Domingues VF, Delerue-Matos C, Monteiro R, Calhau C. *Persistent organic pollutant levels in human visceral and subcutaneous adipose tissue in obese individuals - depot differences and dysmetabolism implications*.; *Environ Res*. 2014 Aug;133:170-7.
196. González-Alzaga B, Lacasaña M, Hernández AF, Arrebola JP, López-Flores I, Artacho-Cordón F, Bonde JP, Olea N, Aguilar-Garduño C. *Serum concentrations of organochlorine compounds and predictors of exposure in children living in agricultural communities from South-Eastern Spain*. *Environ Pollut*. 2017 Nov 9. pii: S0269-7491(17)33095-6.
197. Campillo JA, Fernández B, García V, Benedicto J, León VM. *Levels and temporal trends of organochlorine contaminants in mussels from Spanish Mediterranean waters*. *Chemosphere*. 2017 Sep;182:584-594.
198. Wattigney WA, Irvin-Barnwell E, Pavuk M, Ragin-Wilson A. *Regional Variation in Human Exposure to Persistent Organic Pollutants in the United States, NHANES*. *J Environ Public Health*. 2015;2015:571839. doi: 10.1155/2015/571839.
199. Pestana D, Teixeira D, Meireles M, Marques C, Norberto S, Sá C, Fernandes VC, Correia-Sá L, Faria A, Guardão L, Guimarães JT, Cooper WN, Sandovici I, Domingues VF, Delerue-Matos C, Monteiro R, Constância M, Calhau C. *Adipose tissue dysfunction as a central mechanism leading to dysmetabolic obesity triggered by chronic exposure to p,p'-DDE*.; *Sci Rep*. 2017 Jun 1;7(1):2738.



200. Schram MT, Chaturvedi N, Fuller JH, Stehouwer CD. *EURODIAB Prospective Complications Study Group.; Pulse pressure is associated with age and cardiovascular disease in type 1 diabetes: the Eurodiab Prospective Complications Study.* J Hypertens. 2003 Nov;21(11):2035-44.
201. Pambianco G, Costacou T, Ellis D, Becker DJ, Klein R, Orchard TJ. *The 30-year natural history of type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience.* Diabetes. 2006;55:1463-1469.
202. Taskinen MR. *Quantitative and qualitative abnormalities in diabetes mellitus.* Diabetes. 1992; 41 Suppl 2:12-17
203. Borch-Johnsen K, Kreiner S. *Proteinuria: value as predictor of cardiovascular mortality in insulin dependent diabetes mellitus.* Br Med J (Clin Res Ed). 1987;294:1651-1654.
204. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. *Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study.* JAMA. 2003;290:2159-2167.
205. Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/ EDIC) Study Research Group, Nathan DM, Cleary PA, et al. *Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes.* N Engl J Med. 2005;353:2643-2653.
206. Lehto S, Rönkämaa T, Pyörälä K, Laakso M. *Poor glycemic control predicts coronary heart disease events in patients with type 1 diabetes without nephropathy.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19:1014-1019.
207. Alexander CM, Landsman PB, Teutsch SM, Haffner SM. *Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III).* National Cholesterol Education Program (NCEP). NCEP-defined metabolic syndrome, diabetes, and prevalence of coronary heart disease among NHANES III participants age 50 years and older. Diabetes. 2003;52:1210-1214.
208. Szadkowska A, Madej A, Ziolkowska K, Szymanska M, Jeziorny K, Mianowska B et al. *Gender and age-dependent effect of type 1 diabetes on obesity and altered body composition in young adults.* Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM.2015;22(1):124–128.
209. Jellinger PS, Handelsman Y, Rosenblit PD, Bloomgarden ZT, Fonseca VA, Garber AJ, Grunberger G, Guerin CK, Bell DSH, Mechanick JI, Pessah-Pollack R, Wyne K, Smith D, Brinton EA, Fazio S, Davidson M. *American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Cardiovascular Disease.* Endocr Pract. 2017 Apr;23(Suppl 2):1-87.
210. Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN. *Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases.* Oxid Med Cell Longev. 2017;2017:1273042.
211. Egan BM, Greene EL, Goodfriend TL. *Nonesterified fatty acids in blood pressure control and cardiovascular complications.* Curr Hypertens Rep. 2001 Apr; 3(2):107-16.
212. Boden G. *Obesity and free fatty acids.* Endocrinol Metab Clin North Am. 2008 Sep; 37(3):635-46, viii-ix.

213. Capurso C, Capurso A. *From excess adiposity to insulin resistance: the role of free fatty acids*. Vascu Pharmacol. 2012 Sep-Oct; 57(2-4):91-7.
214. Haus JM, Solomon TP, Marchetti CM, Edmison JM, González F, Kirwan JP. *Free fatty acid-induced hepatic insulin resistance is attenuated following lifestyle intervention in obese individuals with impaired glucose tolerance*. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Jan; 95(1):323-7.
215. Ghosh A, Gao L, Thakur A, Siu PM, Lai CW. *Role of free fatty acids in endothelial dysfunction*. J Biomed Sci. 2017; 24: 50.
216. Iantorno M, Campia U, Di Daniele N, Nistico S, Forleo GB, Cardillo C, Tesauro M. *Obesity, inflammation and endothelial dysfunction*. J Biol Regul Homeost Agents. 2014 Apr-Jun; 28(2): 169-76.
217. Nilsson J, Ares MP, Dichtl W. *VLDL and atherosclerosis*. Endothelial dysfunctions in vascular disease. 2007:85-94.
218. Jiang H, Liang C, Liu X, Jiang Q, He Z, Wu J, Pan X, Ren Y, Fan M, Li M, Wu Z. *Palmitic acid promotes endothelial progenitor cells apoptosis via p38 and JNK mitogen-activated protein kinase pathways*. Atherosclerosis. 2010 May; 210(1):71-7.
219. Harris WS, Bulchandani D. *Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides?* Curr Opin Lipidol. 2006 Aug; 17(4):387-93.
220. Williams, K.J. *Arterial Wall Chondroitin Sulfate Proteoglycans: Diverse Molecules with Distinct Roles in Lipoprotein Retention and Atherogenesis*. Curr. Opin. Lipidol. 2001, 12, 477-487.
221. Haskins K, Bradley B, Powers K, Fadok V, Flores S, Ling X, Pugazhenth S, Reusch J, Kench J. *Oxidative stress in type 1 diabetes*. Ann N Y Acad Sci. 2003 Nov; 1005():43-54.
222. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. *3<sup>rd</sup> Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review*. J Biochem Mol Toxicol. 2003; 17(1):24-38.
223. Dabelea D, Kinney G, Snell-Bergeon JK, et al. *Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes Study Effect of type 1 diabetes on the gender difference in coronary artery calcification: a role for insulin resistance?* The Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes (CACTI) Study. Diabetes 2003;52:2833-2839.
224. Stabley JN, Towler DA. *Arterial Calcification in Diabetes Mellitus: Preclinical Models and Translational Implications*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017 Feb;37(2):205-217.
225. Singh TP, Groehn H, Kazmers A. *Vascular function and carotid intimal-medial thickness in children with insulin-dependent diabetes mellitus*. J Am Coll Cardiol. 2003 Feb 19;41(4):661-5.
226. Savant JD, Furth SL, Meyers EC. *Arterial Stiffness in Children: Pediatric Measurement and Considerations*. Pulse (Basel). 2014 May; 2(1-4): 69-80.
227. Pereira T, Correia C, Cardoso J. *Novel Methods for Pulse Wave Velocity Measurement*. J Med Biol Eng. 2015; 35(5): 555-565.
228. Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H. *Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications*. Eur Heart J. 2006;27:2588-2605.

229. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, *et al.* 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2013 Jul; 34(28):2159-219.
230. Protogerou AD, Stergiou GS, Lourida P, Achimastos A. *Arterial stiffness and orthostatic blood pressure changes in untreated and treated hypertensive subjects.* *J Am Soc Hypertens.* 2008 Sep-Oct; 2(5):372-7.
231. Thanassoulis G, Lyass A, Benjamin EJ, Larson MG, Vita JA, Levy D, Hamburg NM, Widlansky ME, O'Donnell CJ, Mitchell GF, Vasan RS. *Relations of exercise blood pressure response to cardiovascular risk factors and vascular function in the Framingham Heart Study.* *Circulation.* 2012 Jun 12; 125(23):2836-43.
232. Mattace-Raso F, Hofman A, Verwoert GC, Wittemana JC, Wilkinson I, Cockcroft J, *et al.* *Determinants of pulse wave velocity in healthy people and in the presence of cardiovascular risk factors: 'establishing normal and reference values'.* *Reference Values for Arterial Stiffness; Eur Heart J.* 2010 Oct;31(19):2338-50.
233. Reusz GS, Cseprekal O, Temmar M, Kis E, Cherif AB, Thaleb A, Fekete A, Szabó AJ, Benetos A, Salvi P. *Reference values of PWV in healthy children and teenagers; Hypertension.* 2010;56:217-224; *Reference values of PWV in healthy children and teenagers.*
234. Dabelea D, Talton JW, Wadwa RP, Urbina EM, Dolan LM, Daniels SR, Marcovina SM, Hamman RF. *Cardiovascular Risk Factors Are Associated With Increased Arterial Stiffness in Youth With Type 1 Diabetes.* *The SEARCH CVD study; Diabetes Care.* 2013 Dec; 36(12): 3938-3943.
235. Svensson J, Cerqueira C, Kjærsgaard P, Lyngsøe L, Hertel NT, Madsen M, Mortensen HB, Johansen J. *Danish Registry of Childhood and Adolescent Diabetes.* *Clin Epidemiol.* 2016 Oct 25;8:679-683. eCollection 2016.